FLORIN-DAN IRIMIE

Elemente de
BIOCHIMIE

·I·

CLUJ-NAPOCA
1998

©1998, Florin-Dan Irimie

Referenți ·
Prof. Univ. Dr. **Gavril Neamțu**
Prof. Univ. Dr. **Carmen Socaciu**

Pregătire tipografică · «**1024 studio**» Cluj
Tehnoredactare · **Kertész Sándor**

Editat de editura «**Erdélyi Híradó**», Cluj
ISBN 973 98374 9 2

Tipărit la S.C. «**Atid**» Prodimpex, Cluj

Cuprins

Cuvânt înainte 9

Introducere 11

CAPITOLUL 1. Glucide

1.1. Definiție. Clasificare 17

1.2. Chiralitatea ozelor 18
1.2.1. Seriile D și L 18
1.2.2. Ciclizarea monoglucidelor 19

1.3. Derivați ai monoglucidelor și oligoglucidelor 28
1.3.1. Esteri fosforici 28
1.3.2. Aminoglucide 29
1.3.3. Deoxiglucide 30
1.3.4. Alcooli glucidici 31
1.3.5. Acizi glucidici 32
1.3.6. Glicozide 32

1.4. Poliglucide 38
1.4.1. Poliglucide de rezervă 39
1.4.2. Poliglucide de structură 41
1.4.3. Glicoconjugați 45

CAPITOLUL 2. Lipide

2.1. Clasificarea lipidelor 59

2.2. Lipide simple 60
2.2.1. Acilgliceroli 60
2.2.2. Steride 61
2.2.3. Ceride 66
2.2.4. Etolide 67

2.3. Lipide complexe 67
2.3.1. Fosfatide 67
2.3.2. Sfingolipide 72

2.4. Alte lipide 76
2.4.1. Glicozilgliceroli 76
2.4.2. Terpene și terpenoide 76
2.4.3. Icosanoizi 79

2.5. Membrane biologice 82
2.5.1. Caracteristici generale 82
2.5.2. Straturi dublu lipidice 84
2.5.3. Asimetria membranelor plasmatice 87
2.5.4. Distribuția asimetrică a lipidelor 89
2.5.5. Tranziții de fază ale straturilor dublu lipidice și mobilitatea acestora 90

CAPITOLUL 3. Proteine

3.1. Clasificarea proteinelor 92

3.2. Conținutul de proteină al materialelor biologice 95

3.3. Purificarea proteinelor 97

3.3.1. Dezintegrarea celulară 99
3.3.2. Separarea solid-lichid 102
3.3.3. Precipitarea diferențială 103
3.3.4. Metode cromatografice pe coloană 105
3.3.5. Electroforeza 107

3.4. Compoziția proteinelor 109

3.4.1. Conținutul de aminoacizi din proteine 109
3.4.2. Identificarea aminoacizilor N-terminali 111
3.4.3. Identificarea aminoacizilor C-terminali 112

3.5. Structura proteinelor 113

3.5.1. Structura primară a proteinelor 113
3.5.2. Structura secundară 122
3.5.3. Structuri suprasecundare și domenii 134
3.5.4. Structura terțiară a proteinelor 139
3.5.5. Structura cuaternară 143
3.5.6. Considerații generale privind stabilitatea structurii proteinelor 143

3.6. Sinteza chimică a catenelor polipeptidice (Merrifield 1963) 147

3.7. Proteine fibrilare 149

3.7.1. α-Keratina 149
3.7.2. Fibroina 150
3.7.3. Colagenul 151

3.8. Proteine globulare 154

3.8.1. Anticorpi 154
3.8.2. Mioglobina și hemoglobina 166

3.9. Proteine membranare 183

3.9.1. Modalități de interacțiune a proteinelor cu straturile dublu lipidce 184
3.9.2. Hidrofobicitatea catenelor polipeptidice 189

CAPITOLUL 4. Enzime

4.1. Specificitatea și selectivitatea enzimatică 193

4.2. Clasificarea enzimelor 195

4.2.1. Codificarea enzimelor și nomenclatura 195

4.3. Cuantificarea activității enzimatice 198

4.4. Mecanismul de acțiune al enzimelor 199

4.4.1. Stabilizarea stării de tranziție 200
4.4.2. Modalități concrete de reducere a energiei de activare în reacțiile enzimatice 206
4.4.3. Interacțiunea substrat - enzimă 212
4.4.4. Enzime holoproteice 218
4.4.4. Cofactori enzimatici și vitamine 226

4.5. Enzime multimerice 278

4.6. Abzime 280

4.7. Noţiuni de cinetică enzimatică 282

4.7.1. Modelul michaelian, parametri 282

4.7.2. Factorii care influenţează activitatea enzimatică 291

4.7.3. Reglarea activităţii enzimatice 307

CAPITOLUL 5. Acizi nucleici

5.1. Introducere 319

5.2. Constituenţii acizilor nucleici 320

5.3. Structura acizilor nucleici 324

5.3.1. Acizii deoxiribonucleici (ADN) 324

5.3.2. Structura secundară şi terţiară a acizilor ribonucleici (ARN) 346

5.4. Hidroliza acizilor nucleici 353

5.4.1. Hidroliza acidă şi bazică a acizilor nucleici 353

5.4.2. Hidroliza enzimatică a acizilor nucleici 354

5.5. Determinarea structurii primare a acizilor nucleici 359

5.6. Sinteza pe suport solid a oligonucleotidelor 364

5.6.3. Amplificarea (multiplicarea enzimatică) a fragmentelor ADN - metoda PCR (Polimerase Chain Reaction sau policondensarea controlată enzimatic) 367

Bibliografie selectivă 370

Cuvânt înainte

Biochimia se află la confluența a două științe extrem de dinamice: biologia și chimia. Ea este chemată să elucideze mecanismele moleculare ale complexelor procese vitale și deopotrivă să ofere modele de strategie sintetică și alternative mai ieftine și mai prietenoase cu mediul pentru procesarea materiilor prime, subproduselor și chiar deșeurilor, în scopul modificării naturii lor substanțiale.

Direcționarea eforturilor specialiștilor către aceste obiective, conferă biochimiei un ritm de dezvoltare foarte alert, concretizat în explozia numărului de articole de specialitate, al titlurilor de reviste specifice, și al coeficientului de impact al acestora, măsură a gradului audiență.

Sarcina elaborării unei astfel de cărți nu este una dintre cele mai ușoare, pentru că trebuie asigurat un raport rezonabil între componenta biologică și cea chimică a obiectului de studiu.

Conștient de cauzalitatea interacțiunilor moleculare în determinarea complexelor procese vitale, materialul accentuează latura structurală în scopul reliefării acțiunii fiziologice, prin intermediul funcțiunilor proprii compușilor.

În primul volum, cel de față, se prezintă structura și proprietățile claselor fundamentale de biomolecule: glucidele, lipidele, proteinele și acizii nucleici. Se insistă asupra aspectelor generale, definitorii pentru fiecare clasă în defavoarea exemplificărilor detaliate.

Alături de capitolul proteine, materialul dezvoltă pe o întindere mare enzimele, principalii biocatalizatori. Motivul derivă din larga deschidere către caracterul practic, aplicativ, care face din enzime produse deja comerciale, de mare tonaj, utilizate pe scară largă în industria detergenților, farmaceutică, în industria alimentară, în scopuri analitice etc.

Deși intitulat „Elemente de Biochimie", înțelegerea materialului presupune din partea cititorului o familiarizare prealabilă cu noțiunile elementare de chimie, în special organică. Termenul de „elemente" se referă la o introducere sistematică într-un domeniu de graniță și nicidecum la simplitatea noțiunilor expuse.

Materialul este util specialiștilor din chimie, ***chimiști și ingineri chimiști****. Ei vor găsi în funcțiile biologice prezentate, o consecință a structurii și reactivității moleculare. Frumusețea construcției situsului catalitic, perfecțiunea așezării fiecărui component, orânduită de-a lungul multor*

generații, oglindită în activitatea catalitică, specificitatea și selectivitatea, constituie deopotrivă modele dar și mijloace utilizabile. Cartea se adresează cel puțin în egală măsură ***biologilor, medicilor, agronomilor, farmaciștilor****, etc. Insistența abordării aspectelor legate de structura, proprietățile biomoleculelor și detalierea mecanismelor după care decurg interacțiile moleculare, creează baza obiectivă a înțelegerii posibilității, oportunității și modalității intervenției factorului uman pentru valorificarea în interes propriu a potențialului creat de natură.*

Autorul este recunoscător referenților științifici, pentru răgazul de a zăbovi asupra manuscrisului, pentru sugestiile și observațiile făcute. Un cuvânt de mulțumire se cuvine profesorului Sorin Mager, decanul Facultății de Chimie și Inginerie Chimică a Universității „Babeș-Bolyai", care a susținut introducerea liniei biochimice în facultate. Nu pot fi omiși colegii și colaboratorii, din discuțiile cu care, în perioada redactării materialului, au rezultat elemente utile autorului. În fine, un rol decisiv în apariția acestei lucrări, îl au studenții Facultății de Chimie și Inginerie Chimică și cei de la Facultatea de Biologie, specializarea Biologie-Chimie, care prin feed-back-ul realizat, au cizelat forma concretă de transmitere a informației.

Octombrie 1998

Florin-Dan IRIMIE

P.S. În momentele în care prezenta carte se găsea în procesare la editură, lumea biochimiștilor clujeni a fost mișcată de trecerea în neființă a profesorului universitar doctor Gavril Neamțu, unul dintre cei mai prolifici truditori din biochimia românească, referent al cărții de față. Îi aducem profundul nostru omagiu.

Introducere

Biochimia este chimia vieții. Ca entități, moleculele sunt lipsite de viață. Materia vie conține însă molecule, de la cele mai simple până cele mai complexe. Viața este o noțiune extrem de dificil de definit. Ea presupune cooperarea între diferite sisteme biologice prin transferul de substanță și de energie în scopul îndeplinirii funcțiilor vitale. Sistemele vii (organismele) posedă față de sistemele chimice nevii o serie de caracteristici particulare: complexitatea, individualitatea, funcțiile biologice, transferul de energie și de substanță, reproducerea, evoluția, mișcarea și moartea.

Complexitatea organismelor vii constă atât în numărul mare de substanțe care le compun, cât și în nivelurile ierarhice (subsistemelor biologice) care pot fi identificate în interiorul organismelor. La cele mai evoluate organisme, mamiferele, moleculele simple și macromoleculele sunt conținute în celule, care la rândul lor conțin formațiuni infracelulare specializate funcțional, organitele celulare. Un grup de celule cu aceeași funcție constituie un țesut. În *Fig. I.1* se prezintă, după Lehninger ierarhizarea structurilor, de la cele mai simple molecule și până la celulă, unitatea vitală esențială. Cu toată această complexitate, organizarea sistemelor vii este caracterizată prin unitate. Componenții celulari alcătuiesc o serie continuă din punctul de vedere al masei moleculare. Un număr relativ redus de substanțe au o masă moleculară mică, fiind formate dintr-un număr mic de atomi. Menționăm câteva monozaharide, 20 de aminoacizi, opt nucleotide, câțiva alcooli, câțiva acizi grași. Majoritatea substanțelor chimice sunt biomacromolecule obținute prin transformarea și policondensarea moleculelor primordiale. Transformările chimice suferite de substanțe includ întreaga gamă a reacțiilor studiate de chimia organică. Tot legat de complexitatea sistemelor vii, se cuvine a fi amintit caracterul specific și nespecific al compușilor chimici. Compușii primordiali există în toate organismele, la acest nivel deosebirile fiind legate de prezența sau absența unui termen comparat. Constituenții biomacromoleculari, sunt însă specifici de la specie la specie, de la organism la organism. Ei pot exista într-o varietate practic infinită. Amprenta individualului apare în particularitatea structurilor macromoleculare conținute. De aceea încărcătura informațională conținută într-o moleculă depinde de specificitatea

acesteia. Dintre tipurile de biomacromolecule existente, gradul cel mai mare de specificitate îl au acizii nucleici, urmați de proteine și de poliglucide. Funcționalitatea (biochimică) a acestor structuri care asigură posibilitatea transformărilor specifice este asigurată de structurile mic entropice, realizate prin intermediul interacțiunilor Van der Waals, legături de hidrogen, ionice, covalente. Oricât ar fi de complexă, structura materiei vii conține adevărul fundamental că natura chimică a substanțelor care o compun poate fi descrisă și înțeleasă. Chimia celulelor vii nu este altceva decât chimia: chimia organică, în primul rând, chimia supramoleculară, chimia anorganică, chimia fizică, chimia coloidală, chimia...

Constituenții celulari se supun principiilor fizice și chimice care guvernează natura. Procesele biologice, indiferent de complexitatea lor, finalmente pot fi descrise în termeni chimici. Aceasta pentru că logica proceselor și fenomenelor biologice este chimia.

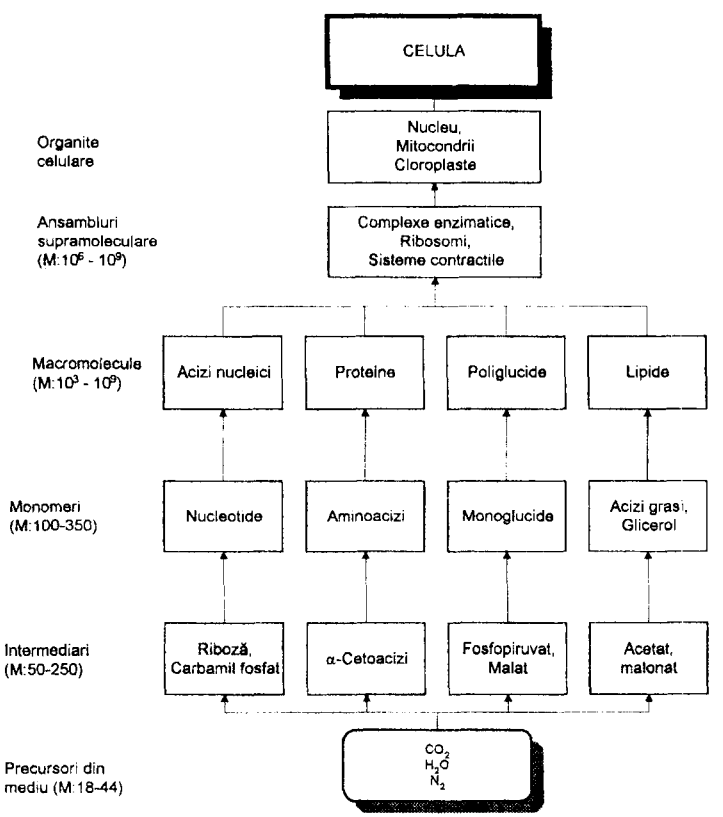


Fig. I. 1. Structura ierarhică a substanțelor bioactive

1. **Individualitatea** caracterizează toate sistemele vii prin aceea că există fie o membrană simplă, fie un perete atașat unei membrane, care asigură separarea dintre sisteme asigurându-le o autonomie vitală limitată.

2. Toate structurile biologice ale unui organism își au rațiunea de a fi într-un **rol funcțional** exercitat. De la părți ale unui organism, precum frunza sau țesutul adipos și până la compușii chimici întâlniți în metabolism, pentru fiecare din aceste elemente se poate identifica un scop al existenței acestora. Caracteristica funcțională este mai degrabă un atribut al structurilor biologice decât a celor fizice sau chimice, aceasta pentru că întrebarea „ce rol are ?" nu se justifică în cazul sistemelor fizice sau chimice nevii.

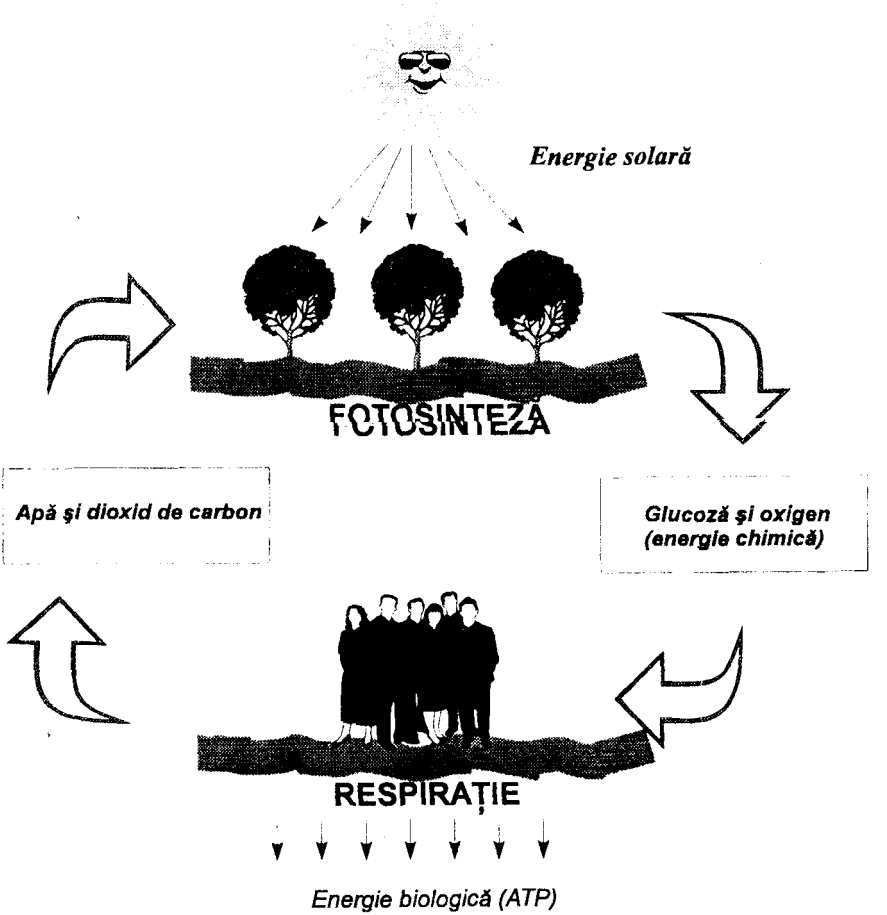


Fig. I. 2. Schimbul de energie și substanță între sistemele vii

3. **Schimbul permanent de energie și substanță** deosebește de asemenea sistemele vii de cele neînsufletite. Sursa finală de energie pentru tot ce este viu o constituie radiația solară. Energia solară este convertită în plante în energie chimică prin formarea în decursul fotosintezei a glucidelor. Acestea, prin lanțul trofic trec la ierbivore și apoi la carnivore, la care energia chimică se stochează și se transportă sub forma unor legături macroergice existente în compuși precum ATP sau NADH. Sinteza de substanță organică, necesară bunei desfășurări a activităților organismelor se face pe baza unei surse de carbon. Organismele fotosintetizatoare folosesc dioxidul de carbon atmosferic, pe care îl convertesc în glucide și alte substanțe organice, care sunt preluate de animale și folosite atât pentru biosinteza substanțelor proprii cât și în scopuri energetice. Produsele de degradare a substanțelor organice în procesele de respirație sunt dioxidul de carbon și apa, care sunt preluate din nou de sistemele fotosintetizatoare la închiderea ciclului carbonului. În interiorul organismului energia este folosită și pentru a menține în stare funcțională o structură înalt organizată, homeostazică, mic entropică, aflată în dezechilibru permanent cu mediul. Numai după moarte se poate instaura echilibrul cu mediul. Transformările energetice și de substanță realizate în interiorul fiecărui organism sunt orientate în scopul bunei funcționări ale acestuia și sunt în esență reacții chimice. Sistematizarea acestora în reacții endergonice de sinteză respectiv exergonice și de degradare definește metabolismul de ansamblu cu cele două laturi ale sale catabolism și anabolism.

4. Poate cea mai remarcabilă însușire a materiei vii o constituie capacitatea de **autoreproducere**. Generație după generație, organismele produc copii virtual identice cu originalul. Mecanismele sunt diferite, mergând de la simpla diviziune la bacterii și terminând cu reproducerea sexuată la plante și animale, dar în fiecare caz în parte sunt caracterizate printr-o mare fidelitate. Totuși această fidelitate nu este perfectă, ea permițând în decursul generațiilor ca prin selecție a caracteristicilor celor mai adaptate mediului să se producă evoluția speciilor. Originea mecanismelor reproductive rezidă în natura chimică a materialului genetic format din dublele catene de acizi deoxiribonucleici. Prin procese de policondensare, care au loc pe matrițe preexistente se asigură fidelitatea copiilor de material genetic, defectele înregistrate ducând la apariția unor caracteristici care în procesul exprimării în mediu pot rămâne sau pot fi eliminate.

5. **Mişcarea** organismelor în mediul biologic îşi are cauza în deplasarea spre sursa de hrană şi de energie, îndepărtarea de sursele de pericol şi devine cu atât mai complex motivată şi realizată, cu cât poziţia organismului pe scara evolutivă este mai înaltă. Natura mişcării este de asemenea chimică, ea realizându-se prin intermediul unor reacţii chimice care implică structuri moleculare specializate.

6. **Moartea** este o însuşire a viului, un punct în spirala infinită a evoluţiei. Fiecare organism se naşte dintr-o zestre genetică acumulată în mii de generaţii, trăieşte, contribuind cu experienţa sa la fondul de informaţie moştenit, după care prin moarte, se reintegrează mediului, lăsând loc noilor indivizi să-şi exercite rolul rezervat în cadrul diviziunii biologice a activităţii în habitatul ocupat.

Sistematizând şi abstractizând la maxim se poate afirma că un sistem este viu dacă:

- poate să se menţină în viaţă, prin nutriţie, asimilaţie, prin reacţiile energetice din respiraţie şi fermentaţie,
- poate să propage viaţa prin reproducere,
- poate să-şi coordoneze individual şi optim activităţile prin sincronizarea şi reglarea reacţiilor chimice de ansamblu.

CAPITOLUL 1. Glucide

1.1. Definiție. Clasificare

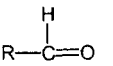
Această clasă de compuși este cunoscută sub mai multe denumiri. Fiecare dintre acestea a încercat să ilustreze o caracteristică general definitorie. Numele de **glucide** sau **zaharide** derivă de la gustul dulce care caracterizează majoritatea termenilor (*glykis* – dulce în limba greacă), iar cel de **hidrați de carbon (carbohidrați)**. derivă de la compoziția generală $(C)_m(H_2O)_n$. În realitate, nici una dintre aceste denumiri nu reflectă o însușire generală, pentru că se cunosc reprezentanți care nu au gust dulce, după cum se cunosc hidrați de carbon care nu pot fi definiți după formula $(C)_m(H_2O)_n$ precum deoxiglucidele, metil glucidele ori aminoglucidele. În pofida acestor imperfecțiuni, cele trei denumiri, sinonime, se utilizează curent. Foarte frecvent se folosește și denumirea de **oze**.

Definiția bazată pe funcționalitatea chimică afirmă că aceste substanțe sunt compuși de tip polihidroximonocarbonilic, ori produși de (poli)condensare a mai multor astfel de structuri.

Având în vedere doar ponderea masică în lumea vie, **glucidele** ocupă primul loc reprezentând astfel o clasă mare și importantă de biomolecule formate în principal prin fotosinteză. Glucidele, atât cele monomerice cât și poliglucidele, îndeplinesc ***funcții*** esențiale în organismele vii. Astfel, ele sunt *substanțe de stocare a energiei.* Prin oxidare energia se eliberează într-o formă utilizabilă de organism. În al doilea rând, multe poliglucide sunt *constituenții majoritari ai pereților celulari* ai bacteriilor și ai plantelor. În fine, glucidele intră în *componența unor alte tipuri de substanțe bioactive* precum unele coenzime sau acizii nucleici.

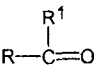
Clasificarea glucidelor are în vedere mai multe criterii:

1. după natura grupării carbonilice distingem:



aldoze atunci când există o grupare aldehidică

cetoze atunci când în structură găsim o grupare cetonică



2. după gradul de policondensare distingem:
   monoglucide (monomeri)
   oligoglucide (di- tri-... deca-)
   poliglucide (cu gradul de policondensare superior valorii 10)

3. Numărul atomilor de carbon din structura monoglucielor le subdivide în: tri-, tetr-, pent-, hex-, hept- **oze,** eventual cu prefixul aldo sau ceto (după caz). De exemplu aldohexoze, cetopentoze etc.

4. În fine, gradul de omogenitate împarte **glicanii** (o denumire generică a tuturor poliglucidelor) în **homo-** și **heteroglicani**, după cum unitățile monomere sunt identice sau nu.

1.2. Chiralitatea ozelor

Cu excepția dihidroxi-acetonei, toate ozele posedă unul sau mai mulți atomi de carbon chirali, ceea ce conduce la apariția izomerilor optici.

1.2.1. Seriile D și L

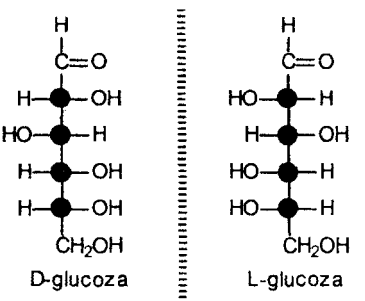


Fig. 1.1. Relația dintre D- și L-glucoză

Cea mai simplă aldoză, aldehida glicerică, un compus monochiral are cei doi enantiomeri desemnați prin D și L. Atribuirea denumirii celor două substanțe a fost făcută aleatoriu, deoarece la data aceea nu era cunoscută configurația absolută a substanței. Semnificația inițială a celor două litere a fost: **D** – dextrogir (rotația planului luminii polarizate la dreapta) și **L** – levogir, (rotația planului luminii polarizate la stânga). Pe baza acestei convenții stabilite de **Emil Fischer**, s-au construit seriile **D** respectiv **L** ale monozelor, după cum atomul de carbon chiral cel mai îndepărtat de gruparea carbonil, are configurația identică cu a celui din

D-glicerinaldehidă sau cu a celui din L-glicerinaldehidă. De aici rezultă că monozele din seria D sunt în relație de **enantiomerie** cu cele din seria L care au aceeași denumire. De reținut că semnificația inițială a notației D respectiv L, referitoare la sensul rotației planului luminii polarizate nu s-a păstrat. Numărul de izomeri optici ai unei molecule chirale este dat de 2^n, unde n este numărul de centre chirale din moleculă. Astfel aldohexozele, de exemplu, posedă patru atomi chirali, prin urmare vor avea $2^4 = 16$ izomeri, adică opt perechi de antipozi optici, fiecare pereche fiind formată dintr-o structură D- și una L-(*Fig. 1.2*). În cazul cetozelor, numărul de atomi chirali se reduce cu unu, la același număr de atomi de carbon. De aceea cetohexozele vor exista sub forma unei familii cu $2^3 = 8$ elemente, respectiv cu patru perechi. Diastereomerii sunt tot izomeri care apar la substanțe cu mai multe centre chirale. Diasteromerii diferă între ei prin configurația unuia sau mai multor centre chirale (dar nu a tuturor). Prin urmare, relația de **diastereomerie** exclude antipozii optici. Un caz particular de diastereomerie îl reprezintă **epimeria**. Epimerii sunt izomeri care diferă între ei prin configurația unui centru chiral. Glucoza și manoza sunt în relație de epimerie. La fel și glucoza cu galactoza, dar galactoza și manoza nu sunt epimeri.

1.2.2. Ciclizarea monoglucidelor

Gruparea carbonil este susceptibilă atacului nucleofil din partea unui reactant corespunzător, cum ar fi o grupare hidroxil. După cum compusul carbonilic este aldehidă sau cetonă, se obține în primă fază fie un semiacetal fie un semicetal. În condițiile unui exces de alcool se obține acetal sau cetal (*Fig. 1.3*)

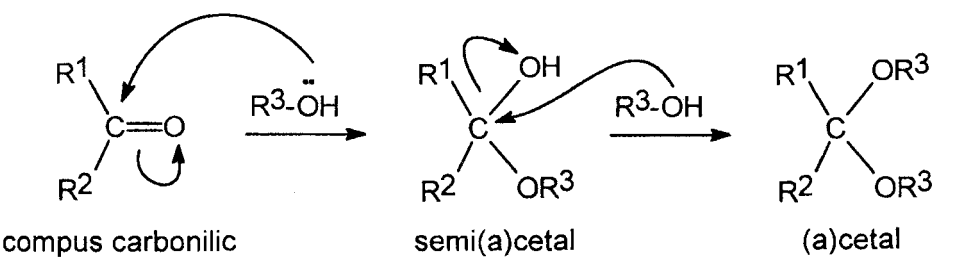


Fig. 1. 2. aldozele și cetozele din seria D, cu până la șase atomi de carbon

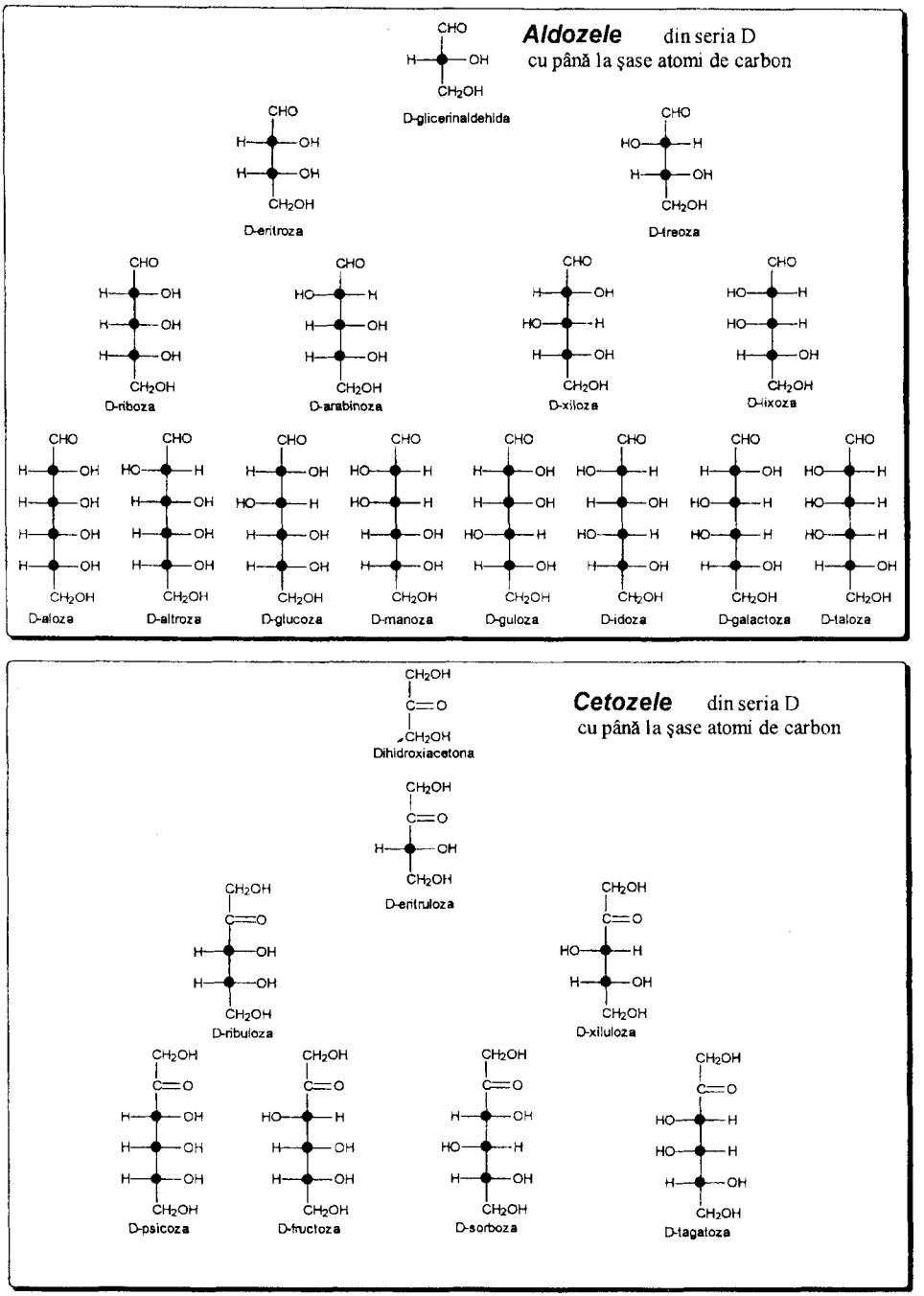
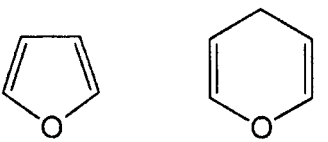


Fig. 1.3. Reacţia dintre un compus carbonilic şi un alcool

Monozele se pot semi(a)cetaliza intramolecular, formând cicluri. Reacția conduce la compuși stabili dacă ciclurile formate au cinci sau șase atomi (numite piranozice, respectiv furanozice, de la heterociclurile corespunzătoare).



furan piran

Carbonul carbonilic glucidic este un centru prochiral. Prin urmare, atacul nucleofil poate conduce la apariția unei perechi suplimentare de izomeri optici, care în cazul particular al monozelor se numesc **anomeri**. Formarea unui anume anomer depinde de fața planului grupării carbonil unde are loc atacul.

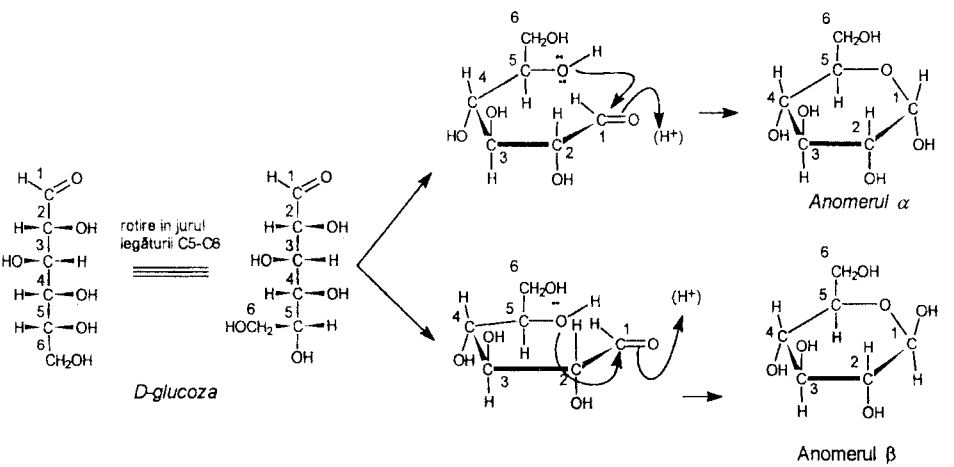


Fig. 1.4. Formarea celor doi anomeri (α și β) dependentă de fața planului carbonului carbonilic (sp^2) unde are loc atacul nucleofil asupra carbonului

Denumirea anomerilor se face prin comparație cu configurația atomului de carbon chiral al glicerinaldehidei. Dacă atomul de carbon care poartă hidroxilul nou format (carbon anomeric) are aceeași configurație cu cel din D-glicerinaldehida atunci anomerul este denumit α. În caz contrar, anomerul va fi denumit β. Interconversia anomerilor poartă numele de **mutarotație**. Acest fenomen este spontan, decurge prin intermediul stării aciclice, și este caracterizat prin echilibru.

Conformerii monoglucidelor

Formele furanozice și piranozice ale monozelor nu sunt plane, datorită unghiurilor tetraedrice ale atomilor de carbon și oxigen hibridizați sp^3. De aceea, formulele plane, HAWORTH, cu toate avantajele conferite de simplitate, nu reprezintă fidel moleculele ciclice. Ciclul piranozic este extrem de răspândit. Unghiurile C-C-C sunt de 111°, ușor diferite de unghiul tetraedric de 109°28'. De asemenea unghiul C-O-C este de 113°. Fiecare piranoză poate exista în două conformații **scaun, -C** (de la chair) șase conformații **baie** sau **barcă -B** (de la boat), șase conformații de tip **barcă torsionată -S** (de la skew boat), 11 conformații **semiscaun – H** (de la half-) și șase conformații **plic**. Codificarea formelor ciclice se face plecând de la un plan central definit de cel puțin trei atomi adiacenți (eventual doi câte doi) folosind numărul atomului de deasupra ciclului ca preexponent, iar cel al atomului de sub ciclu ca indice. Exemplele care urmează vor fi edificatoare.

Conformeri scaun

Formele **scaun (chair -C)** sunt cele mai stabile. La acestea, energia interacțiunilor dintre substituenții ciclului piranozic este redusă la minim. Se cunosc două tipuri de forme scaun $^1C_4$ și $^4C_1$ (*Fig. 1.5*)

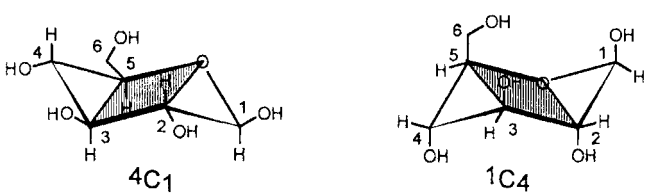


Fig. 1.5. Conformerii scaun (C) ai β-D-glucozei

Pentru evaluarea stabilității uneia sau alteia dintre formele conformerilor scaun s-au elaborat mai multe metode. Dintre acestea le prezentăm pe cele mai semnificative:

A) **metoda factorilor de instabilitate a lui Reeves.** În conformitate cu această metodă, există patru tipuri de factori de instabilitate pentru o moleculă de monoglucidă. Fiecare din acești factori, care sunt cuantificați, poate apare odată sau de mai multe ori, dependent de structura respectivă. Pentru fiecare structură se va calcula suma valorilor factorilor de instabilitate. Suma acestor valori a factorilor de instabilitate va caracteriza un anume conformer. Conformerul cu suma cea mai mică va fi evident cel mai stabil. Cei patru factori sunt:

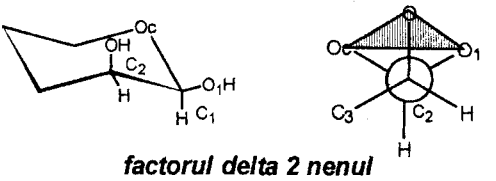


Fig. 1.6. Utilizarea factorului delta

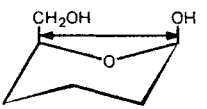
1) factorul delta 2, cuantificat cu o contribuție de *2.5*. Acest factor se aplică în situația în care hidroxilul atașat la C–2 bisectează unghiul dintre atomul de oxigen ciclic și hidroxilul semiacetalic. În acest aranjament, cei trei atomi de carbon implicați vor forma un triunghi isoscel (asemănarea acestuia cu litera grecească Δ este evidentă), de unde numele factorului – (*Fig. 1.6*).

Ceilalți factori de destabilizare împreună cu valorile de corespunzătoare sunt următorii:

2) CH_2OH axial : *2*

3) OH axial : *1*

4) interacțiune diaxială 1,3 între OH și CH_2OH: *2,5*



interactiune 1,3 diaxiala

B) **metoda energiei interacțiunilor necovalente** pleacă de la ipoteza că energiile libere ale conformerilor sunt funcții aditive ale diferitelor tipuri de interacțiuni care pot apare între substituenți (interacțiuni axiale de tip 1–3 și interacțiuni tip gauche axial-ecuatorial sau ecuatorial-ecuatorial). Evaluarea energetică a tipurilor de interacțiuni este prezentată în *Tab. 1.1.*

Tab. 1.1. valorile energetice ale interacțiunilor axiale 1,3 și gauche 1,2

Interacțiuni axiale 1,3	KJ·mol^{-1}	Interacțiuni gauche 1,2	kJ·mol^{-1}
O: H	1,9	O–1e: Oe	2,3
H: C	3,8	O–1e: Oa	4,2
O: O	6,3	Oe: Oe sau a	1,5
O: C	10,5	Ce: Oe sau a	1,9
Efectul anomeric (vezi mai departe) in funcție de OR–1 sau OH–2			1,3

Utilizând aceste valori, s-a calculat ca energia liberă a conformerului $^4C_1$ al glucozei este de 8,5 kJ ·mol^{-1} față de 33,6 kJ ·mol^{-1} la conformerul $^1C_4$. De aici rezultă fără dubii stabilitatea mai ridicată a conformerului $^4C_1$, care are o energie liberă mai redusă. În *Tab. 1.2.* se prezintă conformațiile cele mai stabile așa după cum rezultă prin determinări ^{1}H-RMN[1] și prin calcule aditive ale energiilor a interacțiunilor necovalente. De subliniat că determinările RMN concordă cu calculele.

Tab.1.2. Stabilitatea conformerilor evaluată prin determinări 1H-RMN și calcule energetice

Aldohexoze	Stabilit prin RMN și calcule	Energii de interacțiune kJ·mol^{-1} $^4C_1$	$^1C_4$	Aldopentoze	Stabilit prin RMN și calcule	Energii de interacțiune kJ·mol^{-1} $^4C_1$	$^1C_4$
				α-D-Arabinoza	$^4C_1$	13,40	8,58
α-D-Alloza	$^4C_1$	16,33	22,40	β-D-Arabinoza	$^4C_1$ $^1C_4$	12,14	10,05
β-D-Alloza	$^4C_1$	12,35	25,33	α-D-Lixoza	$^4C_1$ $^1C_4$	8,58	10,89
α-D-Altroza	$^4C_1$ $^1C_4$	15,28	16,12	β-D-Lixoza	$^4C_1$	10,47	14,86
β-D-Altroza	$^4C_1$	14,03	22,40	α-D-Riboza	$^4C_1$ $^1C_4$	14,44	14,86
a-D-Galactoza	$^4C_1$	11,93	26,38	β-D-Riboza	$^4C_1$ $^1C_4$	10,47	12,98
β-D-Galactoza	$^4C_1$	10,47	32,45	α-D-Xiloza	$^4C_1$	8,16	15,07
α-D-Glucoza	$^4C_1$	10,05	27,84	β-D-Xiloza	$^4C_1$	6,70	16,33
β-D-Glucoza	$^4C_1$	8,58	33,49				
α-D-Guloza	$^4C_1$	16,75	19,89				
β-D-Guloza	$^4C_1$	12,77	22,82				
α-D-Idoza	$^4C_1$ $^1C_4$	18,21	16,12				
β-D-Idoza	$^4C_1$	16,96	22,40				
α-D-Manoza	$^4C_1$	10,47	23,24				
β-D-Manoza	$^4C_1$	12,35	32,03				
α-D-Taloza	$^4C_1$	14,86	24,70				
α-D-Taloza	$^4C_1$	16,75	33,49				

Un aspect particular este dat de β-D-glucoză. Această substanță are toți hidroxilii adiacenți în configurația trans. Pe nucleul piranozic al β-D-glucozei hidroxilii vor fi plasați ecuatorial, structura $^4C_1$ fiind favorizată în raport cu $^1C_4$, în acord cu necesitatea minimizării energiei de interacțiune. Anomerul său, α, va avea hidroxilul glicozidic în poziție axială, ceea ce conduce la o anume neregularitate în structura moleculei.

[1] Prin determinări ^{1}H RMN se poate stabili proporția intre doi conformeri într-un solvent oarecare, prin faptul că se pot identifica protonii corespunzători fiecărui conformer. Raportul dintre ei se poate stabili prin integrare.

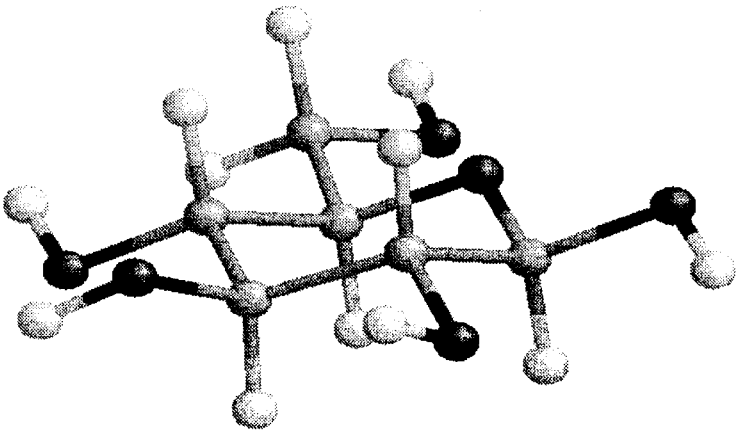


Fig. 1. 7. Structura moleculei de β-D-glucoză

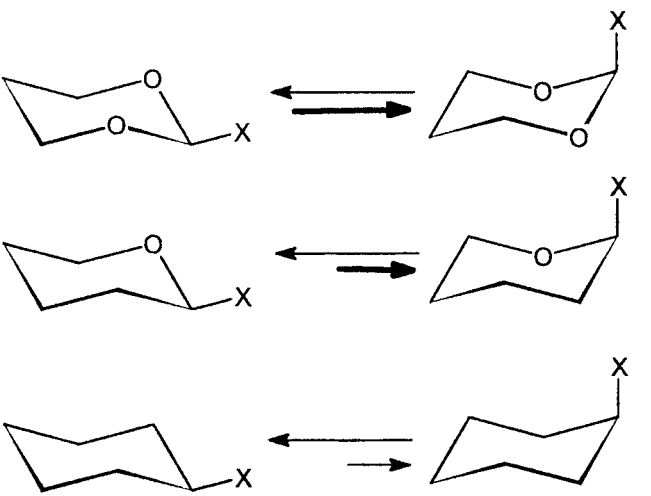
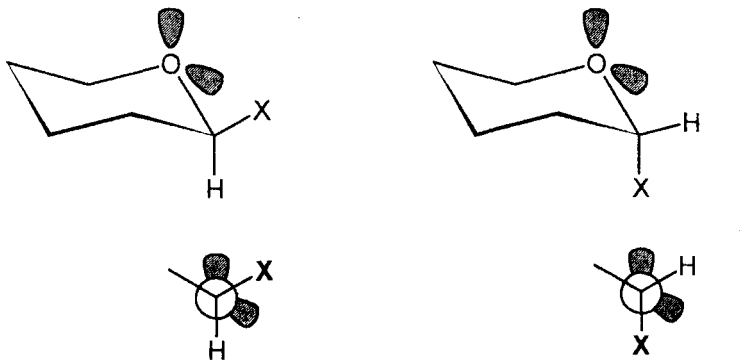


Fig. 1.8. Efectul heteroatomului asupra stabilității conformaționale

Aceasta se va regăsi în proprietăți particulare ale formelor polimerice. Nu menționăm decât diferența de solubilitate în apă dintre celuloză (poli-β–1,4-D-glucoză) și amidon (poli-α–1,4-(1,6)-D-glucoză). Celuloza este practic insolubilă în apă, datorită regularității structurii sale care apare într-o dispunere fibrilară. Acest tip de structură favorizează stabilirea de legături de hidrogen între grupările OH din fibrele alăturate, împiedicând expunerea hidroxililor către exterior.

Spre deosebire de celuloză, amidonul adoptă o conformație elicoidală a catenei, ceea ce permite interacțiunea cu apa din mediu, justificându-și astfel solubilitatea.



anomer β (gauche / gauche) anomer α (gauche / anti)

Fig. 1.9. Explicația efectului anomeric prin interacțiuni orbitale p

Aparent, conformerul β este cu mult mai mai stabil decât cel α. Prin cristalizarea unei soluții apoase sau etanolice de glucoză, la temperatură sub 50°C, se obține însă anomerul α cu $[\alpha]_D^{20}$ = +112,2° (H_2O). La dizolvare, datorită mutarotației se stabilește un echilibru între formele α și β. Soluția va avea o rotație specifică $[\alpha]_D^{20}$ = +52,7° (H_2O). Concentrația de echilibru a formei α este de 37%, ceea ce corespunde unei constante de echilibru de 1,69 (fiind favorizat anomerul ecuatorial), respectiv ΔG_{25}^0 = –1.30 kJ·mol^{-1}. Această valoare trebuie comparată cu variația energiei conformaționale datorate grupării hidroxil în ciclohexan (ΔG_{25}^0 = –3.97 kJ·mol^{-1}). Evident, preferința pentru poziția ecuatorială a hidroxilului anomeric este mai mică decât am fi anticipat-o. Acest comportament preferențial pentru poziția axială a substituentului electrodonor din poziția 2 la oxaciclohexani în general, la monoglucide în particular, este denumită **efect**[2] **anomeric.** Acest efect se poate cuantifica prin diferența diferențelor energiilor substituenților ecuatoriali, respectiv axiali la oxaciclohexanul 2-substituit și la ciclohexanul analog substituit. Există mai multe explicații pentru acest efect. Una dintre acestea se referă la interacțiunile dintre orbitalii p ai oxigenului ciclic și oxigenul (atomul electronegativ) aflat în poziție glicozidică. În cazul anomerului β, orientarea ecuatorială a substituentului **X** (*Fig. 1.9*) va fi gauche cu ambii orbitali p ai oxigenului, în timp ce anomerul α, axial, va fi gauche doar cu un orbital p, respectiv antiperiplanar cu celălalt.

[2] ca întotdeauna când apare o diferență între datele experimentale și teorie

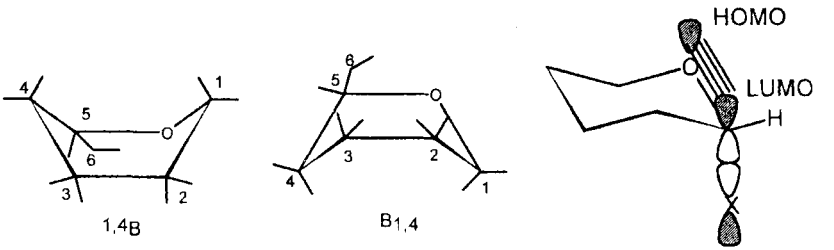


Fig. 1. 10. Conformații mai puțin uzuale la monoglucidele piranozice

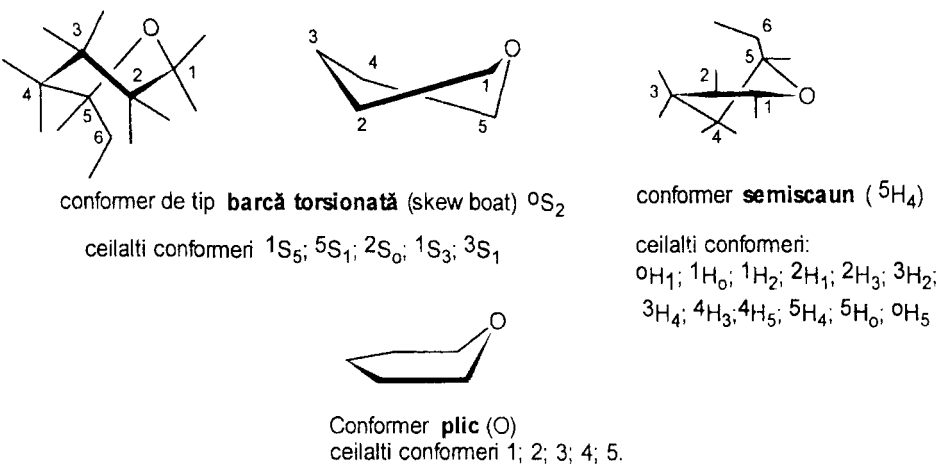

conformer de tip **barcă torsionată** (skew boat) $^{o}S_{2}$
ceilalti conformeri $^{1}S_{5}$; $^{5}S_{1}$; $^{2}S_{o}$; $^{1}S_{3}$; $^{3}S_{1}$
conformer **semiscaun** ($^{5}H_{4}$)
ceilalti conformeri:
$^{o}H_{1}$; $^{1}H_{o}$; $^{1}H_{2}$; $^{2}H_{1}$; $^{2}H_{3}$; $^{3}H_{2}$;
$^{3}H_{4}$; $^{4}H_{3}$;$^{4}H_{5}$; $^{5}H_{4}$; $^{5}H_{o}$; $^{o}H_{5}$
Conformer **plic** (O)
ceilalti conformeri 1; 2; 3; 4; 5.

Fig. 1. 11. Modele piranozice barcă

O altă explicație dată efectului anomeric se bazează pe interacțiunile HOMO – LUMO. Astfel, întrepătrunderea dintre orbitalul HOMO al oxigenului ciclic (un orbital p ocupat) și orbitalul LUMO (σ^*) al legăturii glicozidice este maximă atunci când substituentul anomeric este antiperiplanar față de orbitalul HOMO al oxigenului. Dacă substituentul din poziția glicozidică este electronegativ el va stabiliza această suprapunere. Dacă însă substituentul este hidrogenul, efectul este destabilizant. În cazul anomerilor β, suprapunerea orbitalului HOMO se va face cu orbitalii LUMO implicând hidrogenul și nu cu cei ai substituentului electronegativ (O,S,N sau halogen). În aceste condiții, anomerul β este mai puțin stabil. Efectul este cu atât mai pregnant cu cât solventul este mai puțin polar, substituenul din poziția glicozidică este mai electronegativ și cu cât există substituenți care să perturbe mai puțin prin interacțiuni diaxiale substituentul glicozidic.

Pe lângă conformerii scaun, cu cel mai redus conținut energetic, mai pot fi identificate și cele șase forme **barcă** (B de la boat): $^{1,4}B$; $B_{1,4}$; $^{2,5}B$;

$B_{2,5}$; $^{0,3}B$; $B_{0,3}$. Ceilalți conformeri au o importanță pur teoretică, fiind întâlniți ca forme tranzitorii.

Prezentăm totuși în *Fig. 1.11.* structura celorlalți conformeri tranzitorii piranozici.

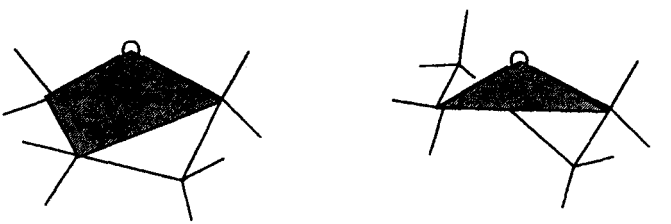


Fig. 1. 12. Conformațiile cele mai comune ale furanozelor

În cazul furanozelor, pot fi identificate două tipuri de conformeri: conformeri **plic**, în număr de zece, la care patru atomi ai ciclului sunt în plan și al cincilea este în afara planului și conformeri **răsuciți (twisted)**, tot în număr de zece, dar la care doar trei atomi sunt coplanari, ceilalți doi fiind de o parte și de alta a planului determinat de ceilalți atomi (*Fig.1.12*).

1.3. Derivați ai monoglucidelor și oligoglucidelor

1.3.1. Esteri fosforici

Sunt combinații extrem de răspândite în lumea vie, fiind biosintetizați de către organismul viu în special prin reacții de transfer de grupări fosforil de pe nucleozidtrifosfați.

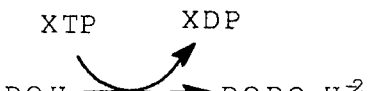


Fig. 1. 13. Mecanismul de formare al esterilor fosforici

Printre cei mai importanți se pot aminti: esterul glucozo–1-fosforic (*Cori*), esterul glucozo–6-fosforic (*Robison*), esterul fructozo–6-fosforic (*Neuberg*), esterul fructozo–1,6-difosforic (*Haarden-Young*), esterul glicerinaldehid fosforic (*Fischer*). Acești compuși sunt intermediari cheie în metabolismul energetic. Un alt exemplu notabil este esterul ribulozo–1,5-difosforic, implicat în interacțiunea primară a dioxidului de carbon cu materia organică în procesul de fotosinteză. Prin fosforilare, glucidele devin anionice.

Valorile pK_a ale esterilor fosforici ai glucidelor sunt cuprinse în plaja 2,1–6,8. Astfel, la un pH intracelular de 7,4 sarcina netă aproximativă a esterului Robison este de 1,8, ceea ce îi permite o interacțiune puternică cu situsul catalitic al enzimei care îl va transforma și, în plus, îi va împiedica traversarea stratului dublu lipidic al membranei celulare.

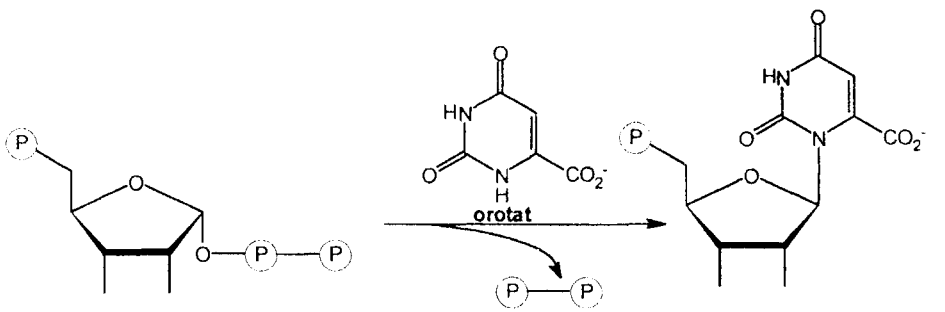


Fig. 1.14. Prin fosforilare se mărește fugacitatea grupării care se substituie

O altă funcție a glucidelor fosforilate o constituie aceea de intermediari activi în formarea de legături O și N-glicozidice:

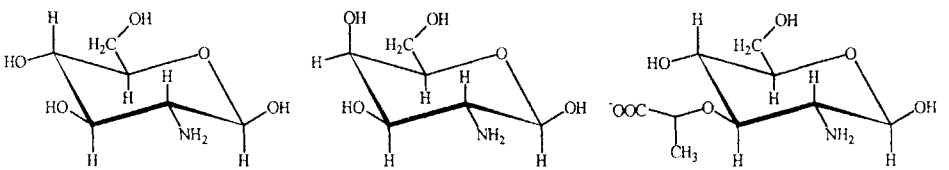


Fig. 1.15. Aminoglucide

1.3.2. Aminoglucide

Se găsesc în constituția multor oligo- și poliglucide. Cei mai comuni reprezentanți ai clasei sunt **N-glucozamina** și **N-galactozamina** care conțin în poziția 2 câte o grupare aminică. ***Chitina***, poliglucida care constituie scheletul extern al crustaceelor și insectelor, este formată din unități de N-acetil-β-D-glucozamină unite prin legături 1,4. Structura acesteia este similară cu a celulozei.

Acidul muramic și **acidul neuraminic**, se găsesc în compoziția polizaharidelor care intră în constituția membranelor celulare sau a peretelui bacteriilor.

Ambii conțin unități de trei atomi de carbon care se atașează de atomii C1 sau C3 ai aminoglucidelor respective. În **acidul muramic** (de la latinul murus = perete), găsit în peretele bacteriilor întâlnim o legătură eterică la atomul de carbon 3 al 2-glucozaminei, cu hidroxilul acidului lactic (*Fig.1.15.*).

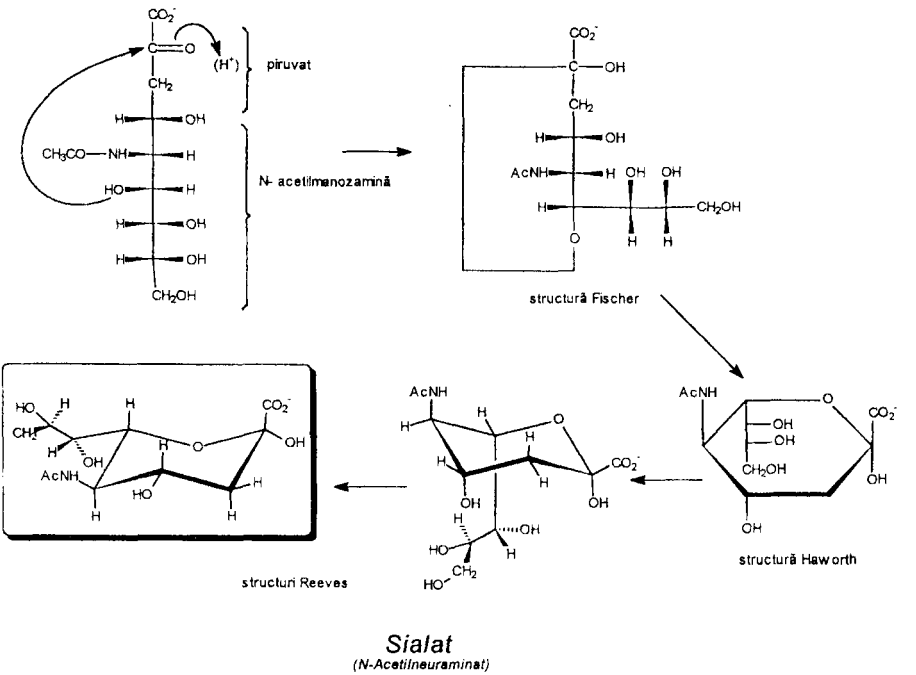


Fig. 1.16. Structuri ale sialatului

În acidul neuraminic (izolat din țesutul neural) întâlnim o legătură C-C între carbonul 1 al N-acetilmanozaminei și acidul piruvic. Prin semicetalizare se formează structură ciclică, ale cărei diverse reprezentări sunt redate mai jos. N- acetil și N-glicolilaminoderivații acidului neuraminic sunt cunoscuți sub numele generic de acizi sialici.

1.3.3. Deoxiglucide

Sunt monoglucide la care una sau mai multe grupe hidroxil sunt înlocuite prin atomi de hidrogen. 2-deoxiriboza este un constituent al acizilor deoxiribonucleici, care sunt întâlniți în toate sistemele vii. Deoxiglucidele se întâlnesc frecvent în glicoproteine și în poliglucide. L-ramnoza și L-fucoza, ambiele 6-deoxiglucide, sunt componenți ai peretelui unor celule și de asemenea intră în compoziția unor glicozide.

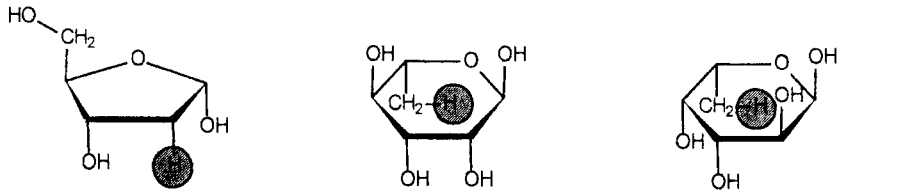


Fig. 1. 17. Deoxiglucide comune

1.3.4. Alcooli glucidici

De regulă sunt produși de reducere ai glucidelor. Exemplul glicerolului (glicerinei) sau al ribitolului sunt clasice. Pe lângă acestea printre cei mai comuni produși de reducere ai glucidelor amintim manitolul, xilitolul, glucitolul (sorbitolul). Reținem că numele alcoolilor glucidici se formează prin adăugarea sufixului **ol** la rădăcina numelui glucidei.

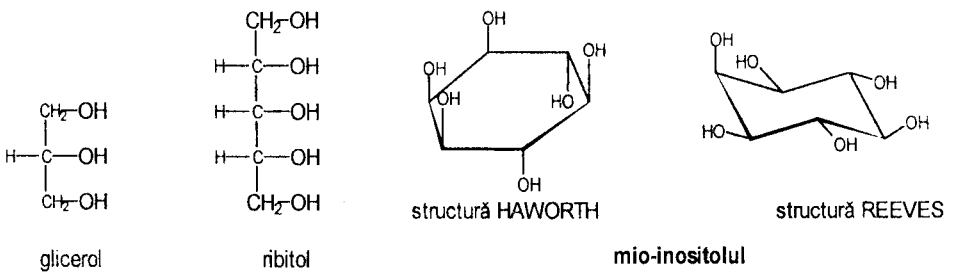


Fig. 1. 18. Exemple de alcooli glucidici

Alte exemple sunt date de alcoolii ciclici. Cei mai răspândiți sunt inositolii, dintre care se detașează ca reprezentativitate mio- sau mezo inositolul, al cărui nume vine de la faptul că a fost descoperit prima dată în mușchiul cardiac. Această substanță, asemănătoare vitaminelor (vezi Capitolul 4. Enzimele) o întâlnim în structura unor glicerofosfolipide membranare. Acestea, prin hidroliză mediată hormonal, eliberează esteri fosforici ai mioinositolului, substanțe care îndeplinesc rolul de mesageri secundari ai unor acțiunii hormonale respective, declanșând o succesiune de evenimente care vor conduce la amplificarea semnalului hormonal inițial.

1.3.5. Acizi glucidici

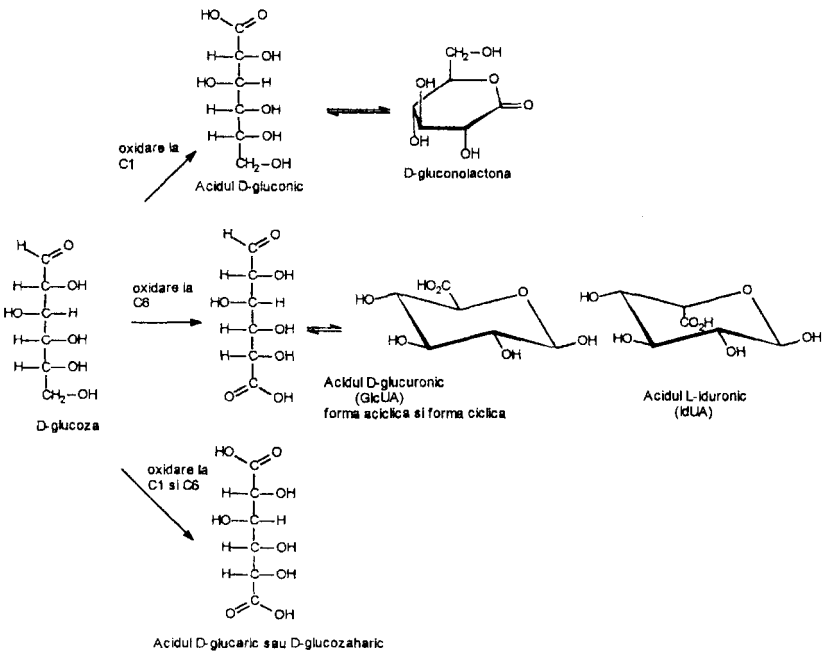
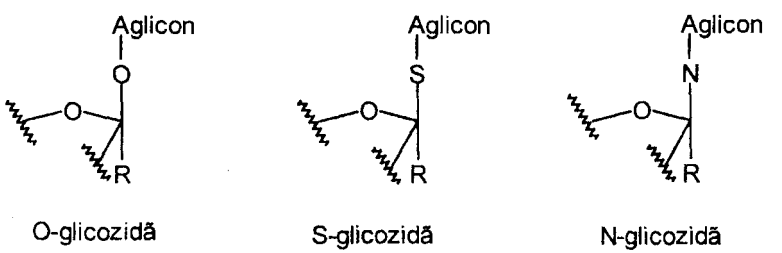


Fig. 1. 19. Formarea diferiţilor produşi de oxidare ai D-glucozei

Monozele se pot oxida la C_1 (aldozele) când rezultă **acizi aldonici**, la Cω, când rezultă **acizi uronici**, sau simultan la C1 şi Cω, când se formează **acizi zaharici** sau **glicarici** (*Fig. 1.19.*).

1.3.6. Glicozide



R = H, CH_2OH

Fig. 1. 20. Structura generală a glicozidelor

Glicozidele sunt substanțe organice naturale formate dintr-o componentă glucidică (mono- sau oligo-) și o componentă neglucidică numită aglicon, unite printr-o legătură glicozidică. În funcție de atomul din aglicon care se leagă de glucidă se disting O, S și N- glicozide. Chimic, legătura dintre cele două componente este de natură (a)cetalică, tio(a)cetalică respectiv aminalică (*Fig.1.20*).

Agliconii pot face parte dintr-o varietate de clase chimice (alcooli, fenoli, amine, tioli etc) și pot îndeplini funcții biologice diferite în celulă, țesut sau organism. De asemenea unii agliconi sunt produși interni de degradare ai unor toxine. Glicozidele sunt formele prin care se transportă sau se stochează unele substanțe, agliconii. Totodată prin glicozilare agliconii pot fi mai ușor transportați în zone în care pot fi metabolizați, materializându-se astfel o funcție particulară de detoxifiere sau protecție în lumea vie.

Majoritatea glicozidelor sunt hidrosolubile, datorită grupărilor hidroxilice. De asemenea toate prezintă activitate optică. Cea mai semnificativă reacție este hidroliza, care poate decurge în cataliză acidă sau enzimatică. În special în plante, glicozidele sunt însoțite de glicozidazele corespunzătoare (enzimele hidrolitice specifice).

O-glicozidele sunt compuși de condensare cu alcoolii sau

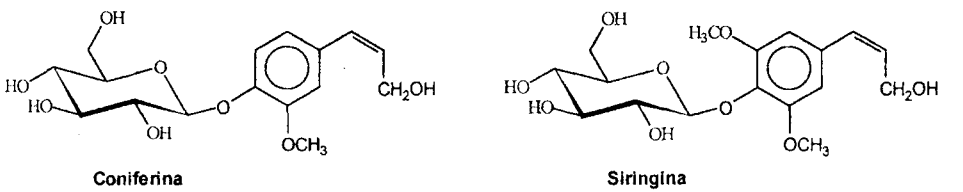


Fig. 1. 21. O-glicozide fenolice

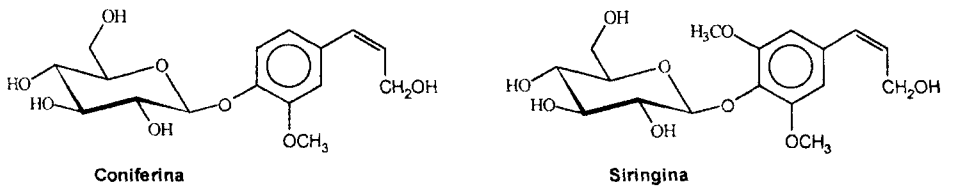


Fig. 1. 22. Glicozide cianogenice

fenolii. *Coniferina* și *siringina*, β-D glucozizii alcoolului coniferilic și respectiv siringic, pot fi identificați în sucul cambial fiind precursori ai ligninelor (*Fig. 1.21.*).

Interesante sunt așa numitele glicozide cianogenice (*Fig. 1.22.*) al căror reprezentant tipic este *amigdalina*, un glicozid al gențiobiozei cu benzocianhidrina. Amigdalina se întâlnește în sâmburii de caisă, piersică, prună, în migdale amare. Prin hidroliză acidă sau enzimatică (cu emulsina) rezultă gențiobioză, acid cianhidric și benzaldehidă. Amigdalaza hidrolizează amigdalina la nivelul legăturii 1,6 β-glicozidice dintre cele două monozaharide, rezultând în acest mod o nouă glicozidă *prunasina* respectiv β-D glucoză. Se pare că funcția biologică a amigdalinei este protecția plantei împotriva insectelor și altor agenți patogeni. O O-glicozidă de sinteză este Laetrilul, în care componenta glucidică este acidul glucuronic, iar agliconul este tot benzocianhidrina. Se pare că această substanță este un agent antineoplazic.

Foarte răspândite în regnul vegetal sunt și glicozidele sterolice dintre care importanță deosebită o prezintă glicozidele cardiotonice (cardiotoxice) precum și glicozidele saponinelor. Ambele tipuri de substanțe au proprietăți tensioactive, dar acțiunea fiziologică le este diferențiată. Prima clasă de compuși, în doze mici, acționează stimulator asupra mușchiului cardiac, în timp ce cea de-a doua clasă provoacă hemoliză. Agliconii glicozidelor cardiotonice se numesc genine. După structura inelului lactonic legat de ciclul ciclopentanic al nucleului steroidic se disting două clase: *cardenolide* (inel lactonic de cinci atomi α-β nesaturat) respectiv *bufadienolide* (inel lactonic de șase atomi cu două duble legături). *Fig.1.23.*

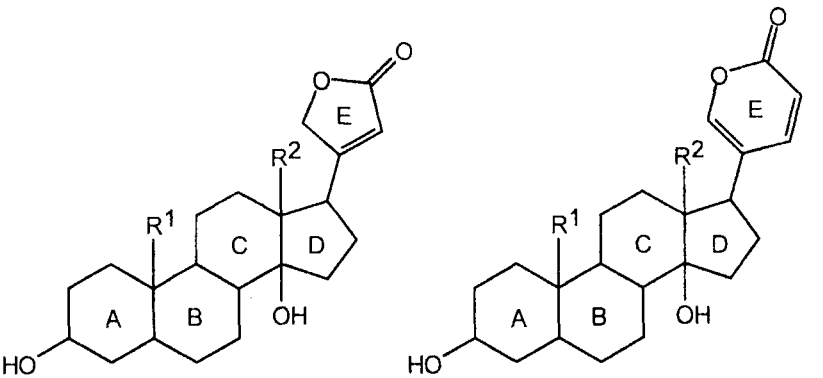


Fig. 1. 23. Agliconi sterolici (genine)

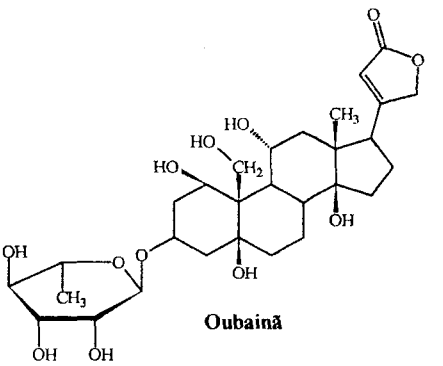


Fig. 1. 24

Surse importante de glicozizi cardiotonici sunt *Digitalis lanata, Digitalis purpurea, Strophantus kombe* pentru glicozide cadenolitice, respectiv *Scilla maritima* pentru cele bufadienolidice. Un exemplu interesant îl constituie oubaina, extrasă din planta oubaio, din Africa de est, care era folosită de indigeni pentru otrăvirea săgeților (*Fig.1.24.*).

Tot în clasa O-glicozidelor sterolice intră și glicoalcaloizii sterolici dintre care se amintesc *α-solanina* (*Fig.1.25.*), substanța care se găsește în plante din familia Solanaceae (*Solanum tuberosum*), al căror fruct le conferă binecunoscuta toxicitate. Prin hidroliză α-solanina eliberează solanidina (agliconul sterolic) și solatrioza, o triglucidă care conține D-glucoză, D-galactoză și L-ramnoză. *Tomatina* este o glicozidă identificată în tomate *Solanum lycopersicum,* cu structură asemănătoare α-solaninei.

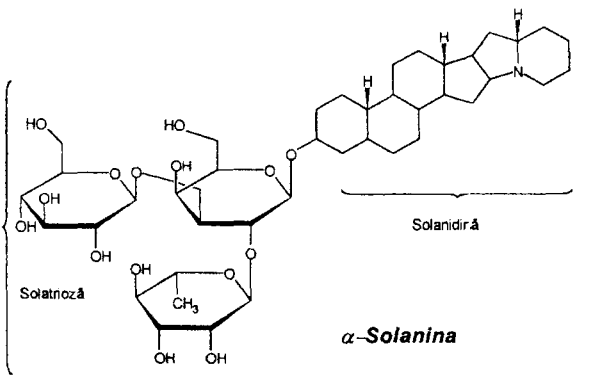
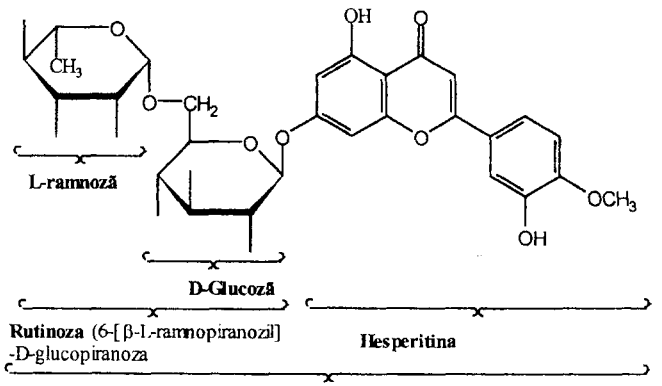


Fig. 1. 25



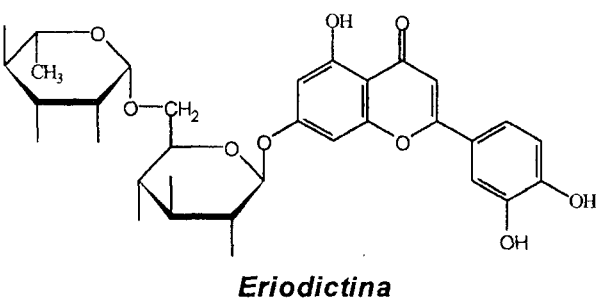


Fig. 1.26. Vitamine P

Pigmenții flavonoidici, extrem de răspândiți în regnul vegetal, unde își manifestă prezența prin coloritul viu conferit în special florilor, se găsesc în special sub formă de β-D glucozizi. Numărul lor este extrem de mare. Tot aici întâlnim grupul așanumitelor vitamine P. (*Fig.1.26.*) De origine vegetală, acțiunea lor constă în reducerea tensiunii arteriale și micșorarea *p*ermeabilității capilarelor sangvine, de unde și numele de vitamine P. Au acțiune sinergică cu vitamina C și prin oxidare pot forma structuri chinonice. Cele mai cunoscute sunt hesperidina (citrina) și eriodictina.

Prin acțiunea hidrolazelor sau oxidazelor asupra unor compuși toxici pentru celulă, aceștia se transformă în compuși hidroxilici, susceptibili de a forma glicozide fără potențial toxic, dar mobile. Acizii ariloxialchilencarboxilici utilizați ca ierbicide pot fi degradați la compuși fenolici, care prin glicozilare formează glicozizi netoxici, mobili. Exemplul acidului 2,4 diclorofenoxiacetic este bine studiat (*Fig.1.27.*):

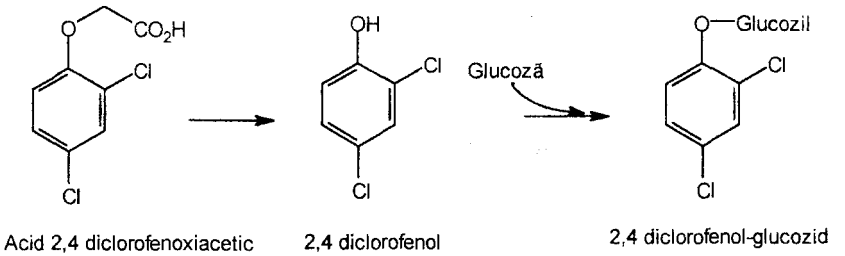


Fig. 1. 27. Glucozilarea acidului 2,4 diclorofenoxiacetic (2,4-D)

Similar suferă reacții de detoxifiere și unele fungicide: etirimolul este un exemplu (*Fig.1.28*)

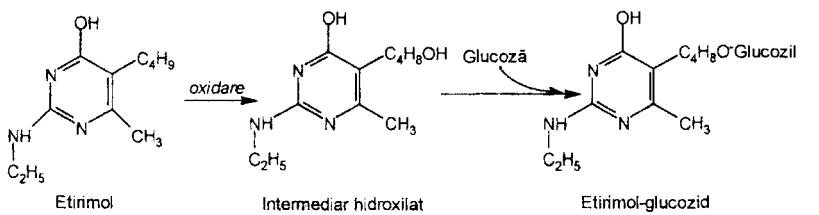


Fig. 1. 28 Glucozilarea etirimolului

*S- **glicozidele*** dau prin hidroliză izotiocianați, glucoză precum și anionul sulfat. Această reacție se produce în organismul vegetal prin intermediul unei β-tioglucozidaze (hidrolaze) specifice, *mirozinaza.*

Fig. 1. 29. S-glicozidele și brasicina ca aglicon S-glicozidic

Structura generală este redată în *Fig.1.29.* Se găsesc în plante care conțin substanțe odorante cu sulf. *Sinigrina* din semințele de muștar negru, prima S-glicozidă descoperită, pune în libertate alilizotiocianat.

Glucobrasicina, identificată în Brasicaceae, pune în libertate brasicina (*Fig. 1.29.*) sau izotiocianatul provenit din metabolizarea acidului indol–3-il acetic fitoregulator de creștere.

N-glicozidele sunt, se pare, cele mai răspândite și studiate glicozide, reprezentanții lor tipici fiind nucleotidele și nucleozidele, substanțe care intră în componența acizilor nucleici (*vezi Cap.5 acizii nucleici*).

1.4. Poliglucide

Poliglucidele sunt compuși macromoleculari extrem de răspândiți, ca rezultat al activității organismelor. În funcție de gradul de omogenitate al glucidelor componente ale catenei policarbohidrice, acești compuși macromoleculari pot fi sistematizați în *homo-* și *hetero-* glicani. Spre deosebire de proteine, a căror structură primară (secvență), implicit lungime, este codificată în genom, poliglucidele sunt create aparent fără existența vreunui model, prin atașarea de mono- sau oligoglucide la o catenă preformată. De aceea, lungimea și compoziția poliglucidelor adesea prezintă o mare diversitate și sunt aparent aleatorii. În realitate s-au pus în evidență structuri repetitive, conservate interindividual și chiar interspecii. Comparând posibilitățile de legare într-o secvență dată a doi aminoacizi cu posibilitățile de legare a două hexoze, se constată că în primul caz se poate realiza o singură legătură peptidică spre deosebire de al doilea caz, când putem realiza cinci tipuri de legături glicozidice (1–1, 1–2, 1–3, 1–4 și 1–6). (*Fig. 1.30*). Din acest motiv (bio)chimia formării oligo și poliheteroglucidelor este mai complexă decât a polipeptidelor iar factorii care determină o anume secvență glucidică nu sunt încă bine cunoscuți.

Majoritatea poliglucidelor pot fi sistematizate după funcția biologică. În concordanță cu aceasta distingem *poliglucide de rezervă* (amidonul, glicogenul, dextranii) și *poliglucide structurale* (chitina și celuloza).

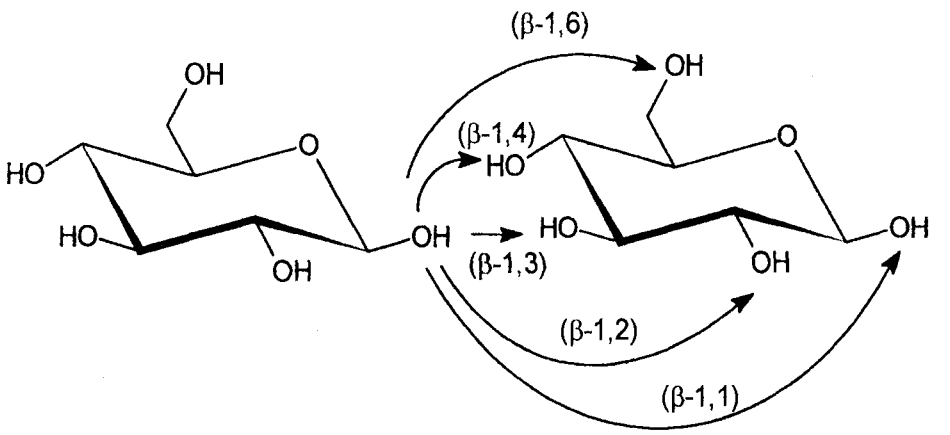


Fig. 1. 30. Posibilități de realizare a unei joncțiuni β-glicozidice

1.4.1. Poliglucide de rezervă

D-glucoza este principala sursă de energie pentru organisme. Ea se găsește în interiorul celulelor sub formă polimerică de amidon, la plante și fungi, de glicogen, la animale precum și de dextran la unele bacterii și drojdii. La bacterii s-a determinat existența în principal a amidonului și a glicogenului.

1.4.1.1. Amidonul

se găsește stocat în celule specializate numite amiloplaste. Forma acestora este specifică fiecărei plante, ceea ce permite identificarea amilosursei. Dimensiunea amiloplastelor variază între 3 și 100 μm. De asemenea amidonul se mai găsește și în cloroplaste, sediul fotosintezei. Amidonul este format din două tipuri de macromolecule:

Amiloza care constituie fracțiunea neramificată a amidonului, formată din 300 - 6000 de resturi de α-D-glucoză legate între ele prin legături de tip 1–4 α glicozidice. În amidon, amiloza are o pondere de 10 - 30%. Deși nu tocmai ușor solubilă în apă, amiloza formează agregate hidratate cu conformație de helix de stînga (*Fig.1.31*). Hidratarea are loc atât în interiorul helixului cât și în exteriorul acestuia. Iodul poate intra în lumenul helixului, în urma interacțiunii particulare rezultând colorația albastră cunoscută de la titrările iodometrice.

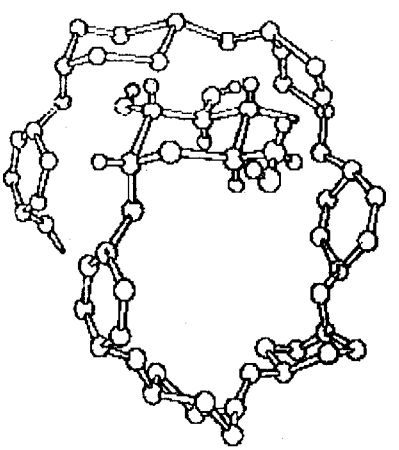


Fig. 1. 31. Structura helicoidală a unui fragment de amiloză

Amilopectina este varianta ramificată a amilozei. Ramificațiile sunt realizate prin legături de tip 1–6 α-glicozidic și ele apar în medie la 25 de resturi de glucoză unite 1–4 α-glicozidic. Lungimea medie a acestor ramificații este de 15–25 de resturi de glucoză. Ramificațiile se pot ramifica la rândul lor, generând structuri arborescente. Interacțiunea cu iodul dă o colorație roșie-violet caracteristică.

Importanți din punct de vedere practic sunt produșii de degradare parțială a amidonului. La utilizare în organism, amidonul este hidrolizat de către amilaze. Există mai multe tipuri de amilsaze, care diferă prin locul unde acționează în catenă (la extremități sau nu) respectiv tipul de legătură pe care îl scindează (α1–4 sau α 1–6). In funcție de gradul de avansare al

hidrolizei se obţin forme cu masă moleculară din ce în ce mai mică, numite generic **dextrine.** În urma utilizării α-amilazelor respectiv β-amilazelor, care scindează doar legături de tip 1–4 la componentele oligo-(poli)glucidice care conţin legăturile 1–6, se obţin oligomeri ramificaţi numiţi **limit dextrine.** Diferenţiate după coloraţia cu iodul, în ordinea descrescândă a masei molare, dextrinele sunt **amilodextrine,** atunci când coloraţia cu iodul este violetă, iar capacitatea reducătoare este practic nulă, **eritrodextrine,** când coloraţia cu iodul este roşie, apărând caracterul reducător, **acrodextrine,** forme puternic reducătoare fără a da coloraţie cu iodul şi **maltodextrine.**

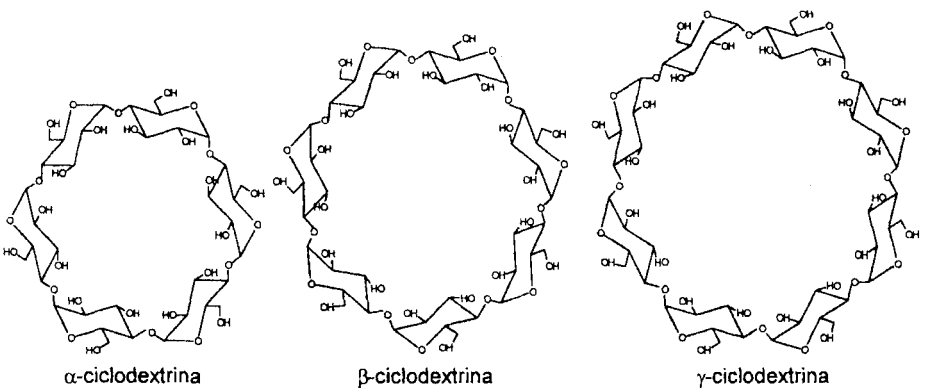
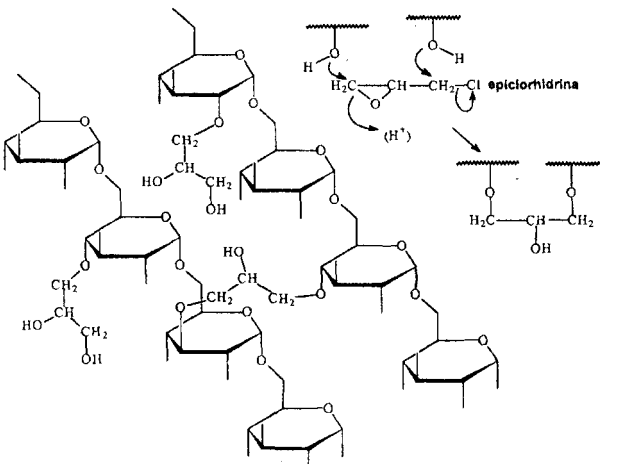


Fig. 1. 32. Tipuri de ciclodextrine

Sub acţiunea unor amilaze bacteriene, precum cele extrase din *Bacillus macerans,* concomitent cu scindarea legăturilor 1–4 ale helixului amilozic are loc reformarea intracatenară a acestora rezultatul fiind apariţia unor dextrine ciclice, cele mai abundente fiind cele cu 6, 7 şi 8 unităţi de glucoză, numite ciclodextrine α, β respectiv γ. (*Fig.1.32.*) Aceste substanţe şi-au găsit utilizare în industria poligrafică şi textilă, ca agenţi de încleiere, iar mai nou ca faze staţionare cromatografice, respectiv ca matrice pentru catalizatori chirali enzimomimetici.

1.4.1.2. Glicogenul

este forma principală de depozitare a glucozei la animale. El se găseşte predominant în ficat, (10 % din masa acestuia), precum şi în muşchii scheletici (1 – 2% din masa acestora). Glicogenul este mult mai ramificat decât amilopectina (o ramificaţie la 8 – 12 unităţi de glucoză).



Structura unui dextran reticulat cu epiclorohidrină şi mecanismul acestei reticulări

Fig. 1. 33. Reticularea dextranilor

1.4.1.3. Dextranii

sunt, alături de glicogen şi amidon, poliglucide de rezervă. Originea lor este bacteriană. Componentul esenţial este α-D-glucoza, care intră în compoziţia polimerului prin legături de tip 1–6. Pe lângă acestea se mai întâlnesc legături minoritare de tip 1–2; 1–3 şi 1–4. Bacteriile care fac parte din flora bucală produc dextrani extracelulari, care constituie un element al plăcii dentare.

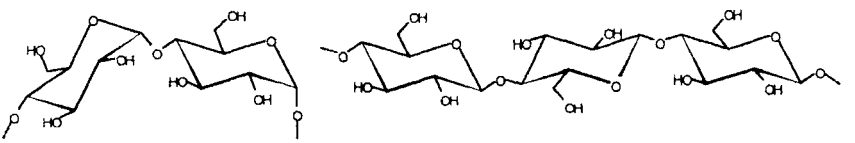
Dextranii au intrat în atenţia laboratoarelor de cercetare ca 'materii prime' pentru fazele staţionare în cromatografia de excluziune sterică (gel filtrare). Dextranii destinaţi acestui scop provin dintr-o bacterie (*Leuconostoc mesenteroides*). Pentru utilizare, dextranul se reticulează cu epiclorohidrină (*Fig.1.33.*). Produşii rezultaţi sunt cunoscuţi sub numele comercial de Sephadex. Există mai multe tipuri de produse Sephadex, care diferă prin gradul de reticulare.

1.4.2. Poliglucide de structură

1.4.2.1. Celuloza

este cel mai răspândit polimer de pe scoarţa terestră. El conferă rezistenţă mecanică pereţilor celulelor vegetale, (plantelor în ultimă instanţă). Această rezistenţă mecanică, completată de delicateţea fibrelor celulozice ale bumbacului sau inului, fac din celuloză o materie primă din ce în ce mai utilizată. Ca şi amiloza, celuloza este un polimer nera-

mificat. Deosebirea constă în proprietățile conferite de legăturile 1–4 α glicozidice din amiloză, respectiv cele 1–4 β glicozidice din celuloză. La amiloză, prin iregularitatea introdusă de poziția axială a oxigenului glicozidic, apare o deformare gradată a catenei, cu consecința apariției unei structuri helicoidale, aptă de interacțiune cu apa, deci o anume solubilitate. La celuloză, toți hidroxilii (inclusiv cel glicozidic) fiind ecuatoriali, prin alternarea rotirii unităților monomerice cu 180° rezultă o catenă liniară (*Fig.1.34*). Catenele liniare ale celulozei se găsesc asociate în planuri, acestea la rândul lor asociindu-se. Asocierile intra- și interplanare sunt realizate prin intermediul legăturilor de hidrogen formate prin cele trei grupări OH per unitate, ceea ce împiedică interacțiunea cu moleculele de apă din mediu, explicând insolubilitatea celulozei.



D-Glucoză legată 1α4glicozidic (în amiloză)

D-Glucoză legată 1β4glicozidic (în celuloză)

Fig. 1. 34. Joncțiuni 1–4α- și 1–4β- glicozidice în amiloză și celuloză

1.4.2.2. Chitina

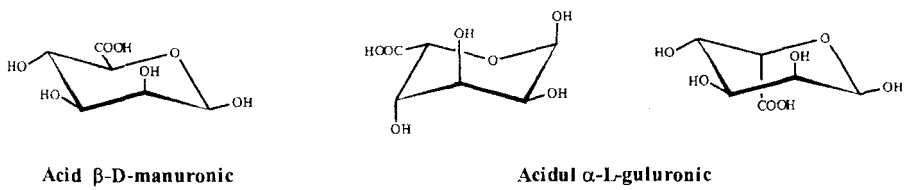
este al doilea polimer ca răspândire pe pământ. Este constituentul principal al pereților celulari ai ciupercilor și de asemenea al exoscheletului insectelor, crustaceelor și păianjenilor. Unitatea monomerică este N-acetil-β-D-glucozamina (**GlcNAc**) și aceasta se leagă 1–4 β glicozidic, formând un polimer asemănător cu celuloza atât la structură cât și la proprietăți. La fel ca și celuloza, chitina începe să fie utilizată ca materie primă. Astfel, ea se utilizează la acoperirea fructelor, în vederea păstrării prospețimii acestora. De asemenea, derivați de chitină sunt utilizați pentru a lega fierul din carne, împiedicându-l să activeze oxigenul din aer care oxidează catenele nesaturate ale lipidelor.

1.4.2.3. Hemiceluloze

Numele acestei clase de polizaharide, propus de SCHULTZE în 1891, nu este cel mai potrivit dar, datorită utilizării, s-a impus. El desemnează o clasă de substanțe considerate precursori ai celulozei (de unde etimologia), relativ ușor de extras din țesuturile vegetale. Astăzi se cunoaște că ipoteza legăturii cu celuloza nu s-a confirmat. Sunt substanțe

cu grad relativ mic de polimerizare (150–200). Posedă o solubilitate relativ redusă în apă. În alcătuirea unei catene intră mai multe tipuri de glucide. După monozaharidul dominant, hemicelulozele se subdivid în trei subclase: *xilani, arabani* și *galactani*, fiecare dintre aceștia conținând polizaharide de o diversitate structurală remarcabilă.

1.4.2.4. Pectine



Acid β-D-manuronic Acidul α-L-guluronic

Fig. 1.35. Acizi uronici constituenți ai unor pectine

Sunt polizaharide prezente parțial în peretele celulei vegetale precum și în sucul plantelor. Substanțe structural asemănătore au fost identificate în constituția unor alge marine (când poartă numele de acizi alginici). Caracteristica structurală a acestei clase de substanțe macromoleculare este participarea în proporție majoritară a acizilor uronici.

În pectinele vegetale predomină acidul galacturonic. Gruparea carboxil poate fi liberă, sub formă de sare, de regulă cu Ca^{2+}, sau sub formă de metil ester.

Au aplicații în industria alimentară, formând geluri transparente după încălzire în mediu acid (pH 2–3.5) în prezență de zahăr, urmată de răcire. Aceasta se întâmplă datorită faptului că la dispersarea în apă pectinele se află sub formă de particule coloidale anionice (prin grupările carboxilat), stabilizate de straturi de apă. Adăugarea de zahăr destabilizează aceste sisteme coloidale, datorită interacțiunilor hidrofile între moleculele de zahăr și cele pectice. Prin reducerea pH-ului, sarcina negativă a pectinelor se neutralizează, permițând aglomerarea acestora în agregate de dimensiune ridicată.

1.4.2.5. Acizi alginici

Au fost identificați în algele brune, (*Phaeophyceae*) și conțin două tipuri de acizi uronici: acidul β-D-manuronic (M) și α-L-guluronic (G) (*Fig.1.35.*), uniți prin legături β–1–4 (*Fig.1.36.*), respectiv α–1–4 glicozidice, (*Fig.1.37.*) Proporția dintre cei doi acizi variază între 2:1 și 1:2. Aceste unități sunt grupate în blocuri.

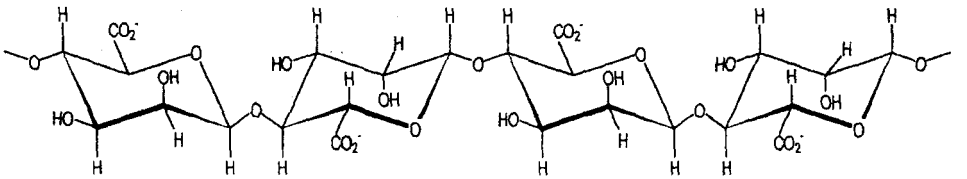


Fig. 1. 36. Secvență de polimanuronat

Catena conține blocuri homopolimere $(M)_n$ și $(G)_m$ precum și blocuri cu secvențe alternante (MG)p. Conformația secvențelor poli-D-manuronice este similară celulozei. În prezența cationilor (Li^+, Na^+, K^+ și Ca^{2+}), însă catena adoptă o conformație de helix.

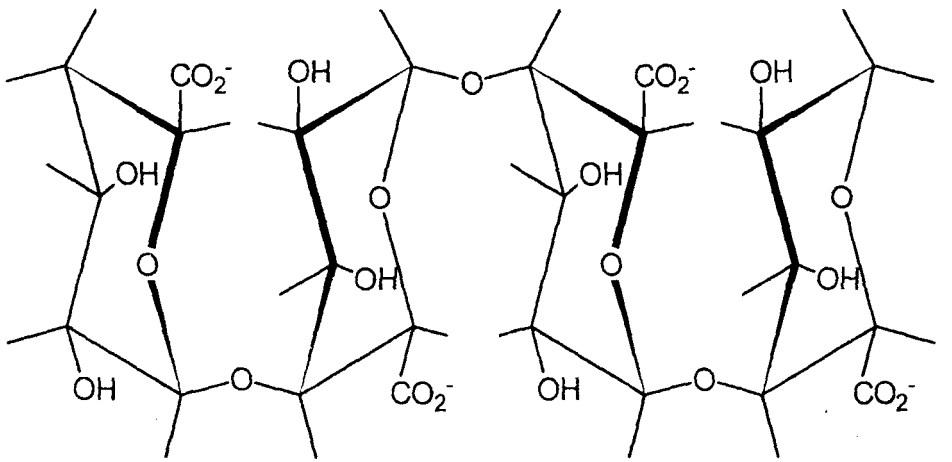


Fig. 1. 37. Secvență de poliguluronat

Spre deosebire de aceste secvențe, cele poli-L-guluronice prezintă un model de bandă ondulată cu mobilitate limitată din cauza configurației diaxiale a legăturii glicozidice. Interstițiile din interiorul benzii pot fi umplute cu molecule de apă sau ioni puțin voluminoși (alcalini). În prezența ionilor de Ca^{2+} se induce formarea unui 'dimer de asociație', a cărui stabilitate este asigurată de ionul inserat între catene, care este stabilizat de grupările carboxilat.

Alginații alcalini și de Mg sunt solubili în apă, în timp ce acizii alginici și sărurile celorlalți cationi sunt insolubili. Sunt utilizați în industria alimentară ca aditivi de îngroșare, iar sub formă derivatizată ca emulgatori. În ultima perioadă sunt mult folosiți la imobilizarea celulelor și a preparatelor enzimatice.

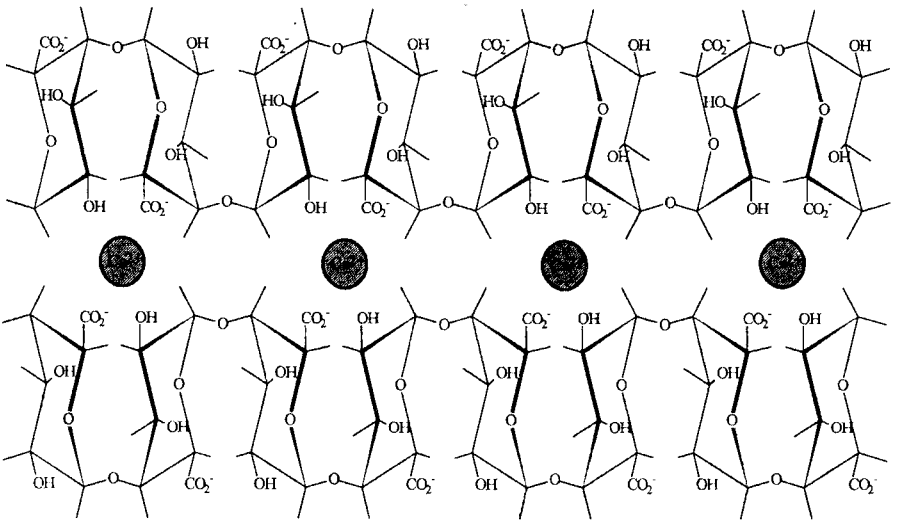


Fig. 1. 38 Porțiune din structura unui alginat de calciu

1.5.1. Glicoconjugați

Oligo- și poliglucidele se pot cupla cu componente proteice sau lipidice formând glicoconjugați. Conjugații cu componente proteice se sistematizează în glicoproteine, proteoglicani și peptidoglicani. Primele două clase de substanțe se formează prin glicozilarea catenei (poli)-peptidice, și sunt caracteristici esențiale ale eucariotelor, în timp ce peptidoglicanii sunt constituenții peretelui celular al bacteriilor.

Prin conjugare gama funcționalității glucidelor sporește, rolul lor în recunoașterea moleculară precum și în patologie justificând apariția glicobiologiei și a glicopatologiei ca domenii biochimice de interfață. Progresele făcute în tehnica experimentală a chimiei glucidelor au avut motivația în funcționalitatea glucidelor sub formă conjugată. François Jacob afirma că: *„împreună cu acizii nucleici și proteinele, hidrații de carbon reprezintă a treia dimensiune a biologiei moleculare."*

1.5.1.1. Glicoproteine

Prin glicozilare, proteinele devin glicoproteine. Glicozilarea ca proces, succede proteosinteza (procesul este posttranslațional - vezi biosinteza proteică Vol. II) și se poate realiza atât enzimatic cât și neenzimatic. În această clasă de substanțe întâlnim reprezentanți cu funcționalitate diversă precum: proteine structurale, enzime, receptori memb-

ranari, proteine de transport, imunoglobuline. Ca efect al glicozilării, componentele proteice vor suferi modificări ale proprietăților lor, ceea ce se va reflecta firesc în noi funcții:

♦ prin glicozilare *crește solubilitatea componentei proteice.* Mai mult, catenele oligoglucidice pot masca resturile hidrofobe ale aminoacizilor din proteine, influențând interacțiunile proteină: proteină.

♦ prin glicozilare componenta proteică adoptă conformații particulare care îi *facilitează transferul prin membrana reticulară și plasmatică.* Aceste conformații sunt rezultatul stabilizării structurilor proteice de tip terțiar și cuaternar, (vezi structura proteinelor) cu participarea legăturilor de hidrogen și a interacțiunilor van der Waals.

♦ prin glicozilare se poate realiza *regioselectivitatea proteolizei,* componenta glucidică orientând enzima proteolitică strict către legătura peptidică vizată.

♦ prin glicozilare se poate realiza și *protecția față de proteoliză*: exemplul glicoproteinelor epiteliului tractului digestiv este edificator. Prin impiedicarea glicozilării sau prin impiedicarea atașării la capătul restului glucidic a acidului sialic (vezi mai departe), are loc expunerea legăturilor peptidice acțiunii enzimelor proteolitice. În acest context apare limpede dependența ulcerului tractului digestiv de sializare sau de glicozilare.

♦ prin glicozilare se realizează reglarea permeabilității membranare. Glicoconjugații membranari (vezi proteinele membranare) creează *bariere hidrofile* pe suprafața celulară, mărindu-se selectivitatea accesului intracelular. Acest proces se poate realiza prin două mecanisme. Primul dintre ele este datorat creșterii gradului de hidrofilicitate, ca efect al glicozilării. Cel de-al doilea, numit *efect chaotropic,* se datorează orientării specifice a moleculelor aflate în tranzit, prin distribuția spațială locală a resturilor

♦ distribuția spațială locală a resturilor glucidice mai hidrofobe (fucoză) respectiv mai hidrofile (acid sialic). Orice modificare în compoziția și distribuția glicoproteinelor membranare poate genera dezordini metabolice majore prin perturbarea selectivității traficului membranar al substanțelor bioactive.

Se pare că glicoproteinele reprezintă forma principală sub care există proteinele. Le găsim atât sub formă circulantă (enzime, hormoni, agenți de transport, anticorpi etc.) cât și ca substanțe extrinseci respectiv integral membranare (*Fig.1.39.*). În cazul proteinelor circulante putem aminti că în plasma sangvină, din cele cca. 60 de tipuri de proteine exis-

tente, (cu excepția albuminei[3], a prealbuminei și a lizozimului plasmatic) toate sunt glicozilate.

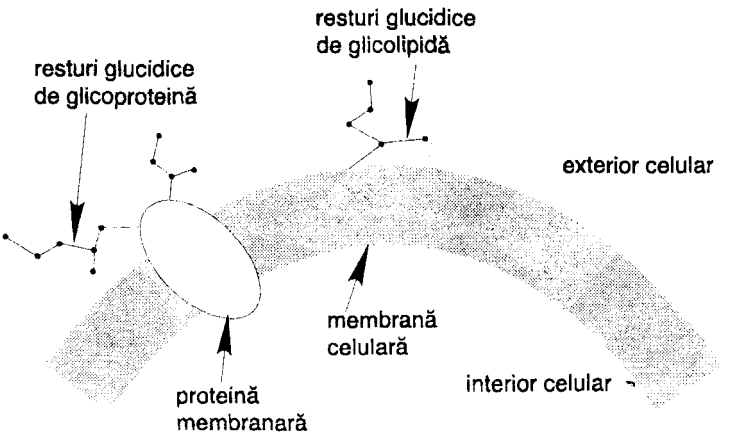


Fig. 1. 39. Poziționarea componentelor proteice și lipidice glicozilate în membrana celulară

Joncțiunea glucidei cu componenta proteică se face în cazul glicoproteinelor prin două moduri fundamentale (*Fig.1.40*):

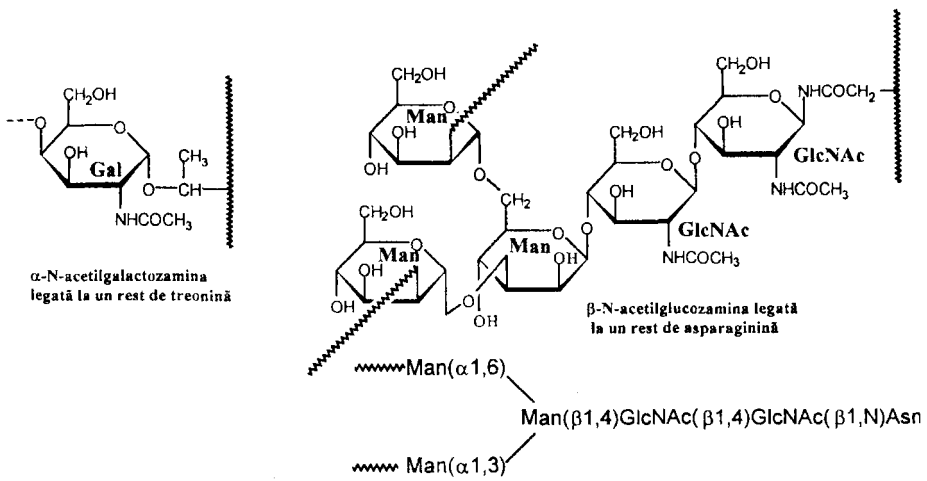


Fig. 1. 40. Modele ale joncțiunilor de tip O- și N-glicozidice între componenta proteică și cea glucidică

[3] Albumina serică este o proteină de transport a numeroase substanțe precum acizi grași hormoni, ioni și substanțe medicamentoase.

♦ prin legături de tip **N-glicozidic** (prin intermediul azotului amidic al asparaginei).

Asparagina de legătură din glicoproteinele legate N-glicozidic se găsește întotdeauna într-o ambianță de tipul **Asn-X-Ser** sau **Asn-X-Thr** unde **X** poate fi orice aminoacid, mai puțin prolina, **Asn** asparagina, **Ser**- serina, iar **Thr**- treonina. Motivul joncțiunii N-glicozidice prezentat în fig., se continuă cu două structuri identificate în marea majoritate a cazurilor:

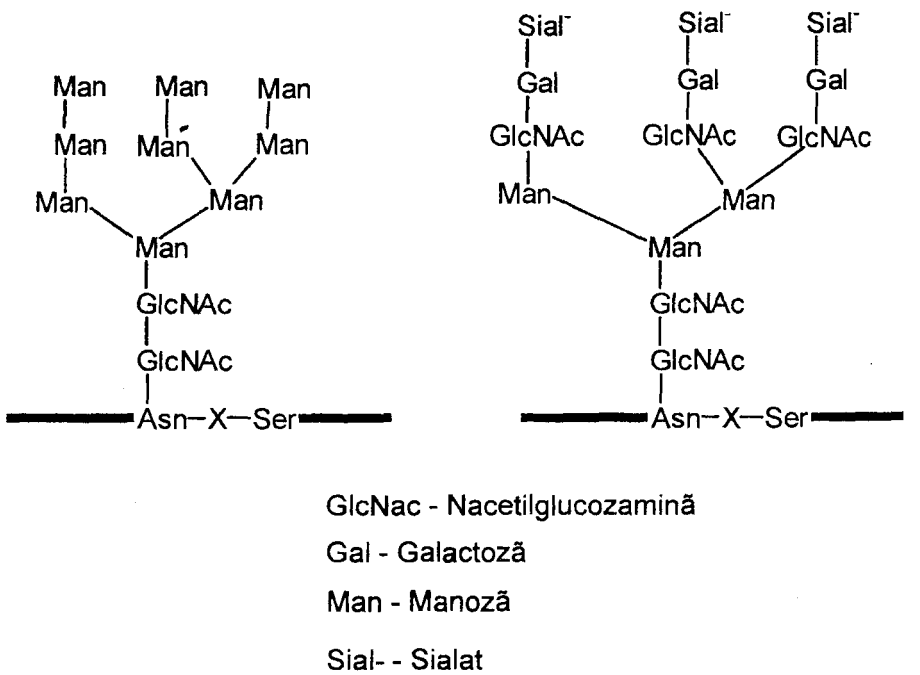


Fig. 1. 41. Structuri glicoproteice triantenare legate N-glicozidic

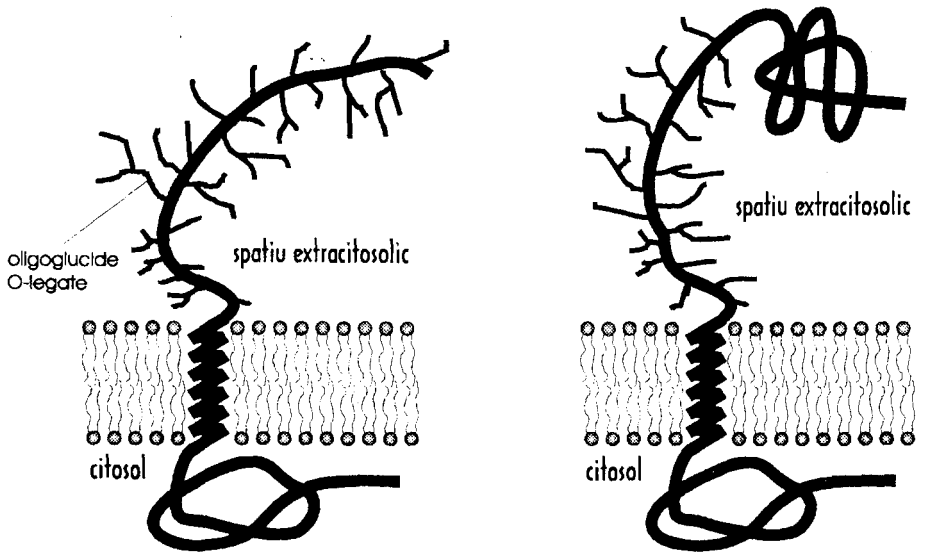
♦ prin legături de tip **O-glicozidic** (prin intermediul serinei, treoninei sau hidroxilisinei). Acest tip de legătură este mai sensibilă la acțiunea alcaliilor. Cel mai frecvent tip de joncțiune O-glicozidică este α-N-acetilgalactozamina (**GalNAc**) legată de treonină. Se întâlnește la glicoproteinele de grup sangvin, globulinele plasmatice, la unele glicoproteine membranare. La ciuperci și drojdii se întâlnește frecvent joncțiunea β-manoză (**Man**) - serină sau treonină. În plante, arabinoza (**Ara**) se leagă de hidroxiprolină printr-o legătură O-glicozidică mai rezistentă la alcalii decât celelalte. S-au mai identificat și alte glucide, precum

β-galactoza (**Gal**), α-L-fucoza, (**Fuc**), α- şi β- glucoza (**Glc**), β-xiloza (**Xyl**). Componentele esenţiale ale tutoror glicoproteinelor O-glicozidice sunt, pe lângă cele mai sus menţionate, manoza, fucoza şi acidul sialic (N-acetilneuraminic sau **NANA**), ultimele două fiind întâlnite la glicoproteinele circulante.

Glicoproteinele cu joncţiune O-glicozidică sunt extrem de diverse ca funcţionalitate şi răspândire. O menţiune aparte trebuie făcută pentru **mucine**, o categorie de glicoproteine care se găseşte în tractul gastrointestinal şi cel respirator, cu rol de protecţie asupra membranelor celulare externe. Aceste glicoproteine, cu masă molară relativ ridicată, acoperă lungimi remarcabile la scară moleculară (de ordinul a 1500 –2000 Å), protejând astfel suprafaţa membranară. Conformaţia relativ rigidă şi gradul mare de hidrofilie duc la creşterea locală a viscozităţii, ceea ce reprezintă o barieră protectoare suplimentară.

Multe dintre O-glicoproteine sunt ataşate membranei plasmatice. Prin glicozilarea catenei în zona extracitosolică, catena polipeptidică este forţată prin interacţiunile cu componentele glucidice să adopte conformaţii cu grad de împachetare cât mai redus, care pot fi stabilizate de mediul hidrofil extracitosolic. După extinderea amplasării catenelor glucidice pe componenta proteică se disting două tipuri de O-glicoproteine membranare: *tipul I* reprezentat de **leucosialină**, care posedă întreaga porţiune extracitosolică glicozilată, asemenea mucinelor şi *tipul II* reprezentat de receptorul **LDL** (Low Density Lipoprotein receptor– receptorul lipoproteinei de densitate redusă), în care doar o porţiune adiacentă membranei plasmice este glicozilată, capătul terminal, extracitosolic rămânând neglicozilat şi în consecinţă, datorită resturilor hidrofobe ale aminoacizilor din această porţiune, va adopta o conformaţie împachetată, aptă să recunoască şi să interacţioneze cu biomoleculele specifice (*Fig. 1.39.*)

Secvenţa şi modul de legare al unităţilor glucidice în glicoproteine, deşi sunt aparent aleatorii, prezintă un determinism strict ce constituie un veritabil limbaj de comunicare intercelulară (prin intermediul glicoproteinelor membranare), între celule şi diferiţi hormoni, particule virale sau bacterii. Câteva din exemplele de mai jos vor oferi o imagine asupra extinderii funcţionalităţii proteinelor prin glicozilare.



Glicoproteine tip I
(cap extracitosolic glicozilat total)

Glicoproteine tip II
(cap extracitosolic neglicozilat)

Fig. 1. 42. Cele două tipuri fundamentale de glicoproteine membranare

A) Cronomarkeri glicoproteici

Componentele glucidice ale glicoproteinelor pot constitui etichete pentru circulația sau distrugerea glicoproteinelor. Spre exemplu, la suprafața celulelor hepatice acționează așa-numitul receptor asialoglicoproteic. Acesta nu interacționează cu glicoproteinele care posedă ca unitate terminală acidul sialic (imunoglobuline, hormoni peptidici). Acesta este însă îndepărtat cronobiologic de sialaze specializate, existente pe suprafața vaselor sangvine, lasând liberă manoza, ori galactoza care este componentul adiacent. Manoza (galactoza) devenită astfel terminală, este recunoscută de receptor, legată de acesta, realizându-se astfel condițiile intrării glicoproteinei în celulă (endocitoză). În interiorul celulei glicoproteina va fi hidrolizată de echipamentul enzimatic existent.

B) Abilități anticongelante ale glicoproteinelor.

Un exemplu interesant de glicoproteine cu legături O-glicozidice la joncțiunea glucidă - polipeptidă îl constituie compușii identificați în sângele peștilor care trăiesc în apele reci (–1,9°C) din regiunile arctice și antarctice. Componenta peptidică are secvența: $[Ala\text{-}Ala\text{-}Thr]_n$-Ala-Ala, cu n = 4,5,6,12,17,28,35,45 sau 50.

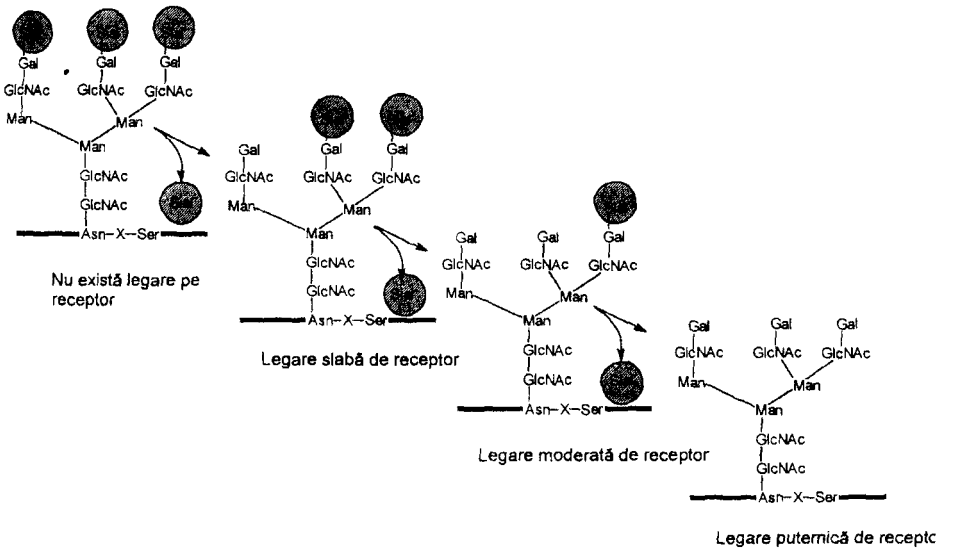


Fig. 1. 43. Desialarea succesivă a glicoproteinelor măreşte succesiv afinitatea acestora pe receptorii asialoglicoproteici

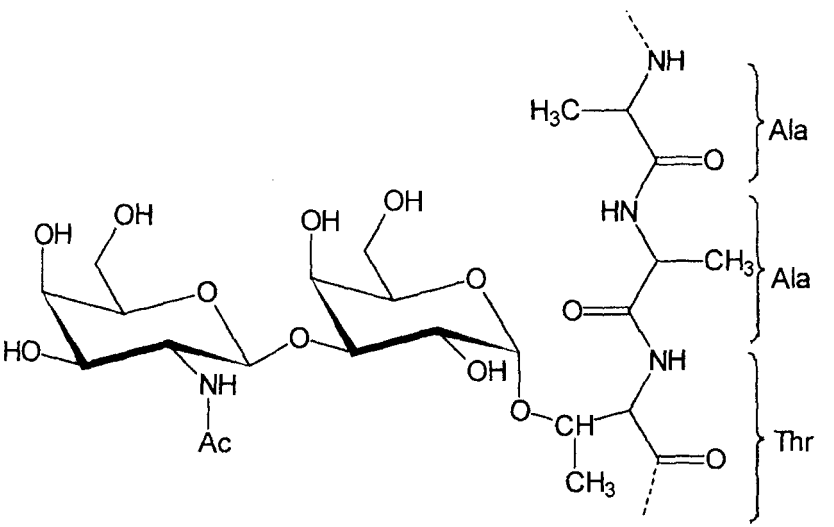


Fig. 1.44. Glicoproteină anticongelantă

Fiecare rest de treonină este glicozilat cu o dizaharidă β-galactozil-(1–3)-α-N-acetilgalactozamină. Se pare că proprietăţile anticongelante ale acestor structuri cu aspect de bastonaş mobil se datorează abilităţii lor de a interacţiona cu centrii de cristalizare care apar în masa apoasă, împiedicând expandarea cristalelor de gheaţă.

C) Lectine

Lectinele sunt proteine sau glicoproteine de origine non-imună, capabile să lege componente glucidice libere sau conjugate. Ele conțin cel puțin două situsuri de legare a glucidelor. Aceasta explică abilitatea lectinelor de a precipita poliglucidele, conjugatele glucidice cu proteinele și lipidele precum și capacitatea de a aglutina celulele. Deși sunt ubiquitare (se găsesc în majoritatea organismelor), sursele cele mai importante sunt cele vegetale. Existența lectinelor materializează un *mecanism particular de recunoaștere celulă-celulă,* bazat pe structura lectinică (piesa) prin care se face joncțiunea. Exemple de lectine sunt *Concanavalina A* cu specificitate față de resturile de D-manosil, identificată în fasole, *aglutinina* din germenii de grâu cu specificitate față de resturile de N-acetilglucozamină și altele, prezentate în *Tab.1.3.* Unul din rolurile lectinelor este legarea de rădăcinile plantelor a bacteriilor fixatoare de azot. Aceasta se realizează prin legarea specifică la componentele glucidice ale plantei și ale bacteriei. Fixarea bacteriei *Escherichia coli* de celulele tractului intestinal este mediată tot de o lectină, bacteriană de această dată. Lectinele sunt folosite ca faze staționare în cromatografia de afinitate pentru separarea glucidelor și chiar a glicoproteinelor. În *Tab. 1.3* se prezintă câteva dintre cele mai comune lectine utilizate, în funcție de glucida pentru care prezintă afinitate de legare. Sunt prezentate de asemenea motivele (monoglucida sau secvența) care se poate atașa competitiv de lectină inhibând astfel capacitatea de legare de receptorii specifici de pe suprafața celulară (ceea ce duce la inhibiția aglutinării).

Tab. 1.3. Lectinele cel mai utilizate in studii structurale și la izolarea glucidelor după specificitatea pentru componenta glucidică

Specificitate pentru monoglucidă	Originea lectinei	Abreviatie	Structura celor mai inhibitorii motive glucidice ale hemaglutinarii
α-D-Man; α-D-Glc	*Canavalia ensiformis*	Con A	GlcNAc(b1-2) Man(α1-)
	Galanthus nivalis	GNA	Manoză terminală (β-1,3)
	Lens culinaris	LCA	α-Manoza+Fuc(α1,6)GalNAc
β-D-Gal; β-D-GalNAc	*Ricinus communis*	RCA	β-Gal terminala
	Erythrina cristagalli	ECA	Gal(β1-4)GalNAc
	Arachis hypogea	PNA	Gal(b1-3)GalNAc(a1-O)Ser/Thr
	Dolichos biflorus	DBA	α-D-GalNAc terminală
	Glycne max	SB	GlcNAc(α1-O)Ser/Thr
β-D-GlcNAc	*Triticum vulgare*	WGA	GlcNAc(β1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc
α-L-Fuc	*Aleuria aleurantha*	AAA	Specificitate largă
	Lotus tetragonolobus	LTA	α-L-Fuc terminal
	Ulex europeus I	UEA-1	Fuc(α1-2)Gal(β1-)
α-NeuAc	*Limulus polzphenus*	LPA	NeuAc(α2-3 si 2-6)Gal
	Sambucus nigra	SBA	NeuAc(α2-6)Gal
	Maackia amurensis	MAA	NeuAc(α2-3)Gal

1.5.1.2. Proteoglicani

Proteoglicanii constituie o clasă aparte de conjugate poliglucidice. Caracterul particular al acestei clase de conjugați constă în componenta glucidică, numită **glicozaminoglican**, care este un oligomer format prin policondensarea unei unități diglucidice. În diglucida repetitivă există cel puțin o grupare aminică acetilată sau sulfatată, precum și cel puțin o grupare acidă (carboxilică ori sulfurică). Glicozaminoglicanii sunt polianioni la pH-ul fiziologic, putând atașa apa, cationi anorganici ori structuri cationice organice, determinând proprietățile vâscoelastice ale articulațiilor și ale altor structuri supuse deformațiilor mecanice.

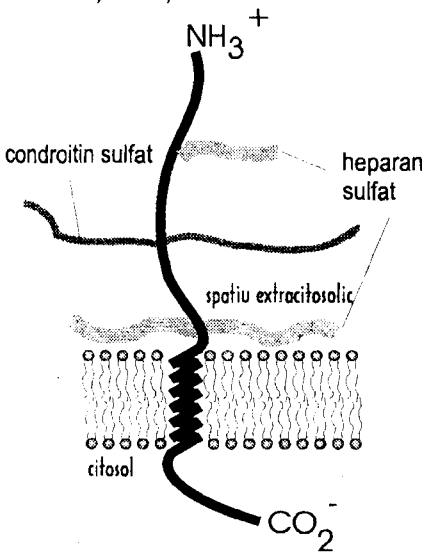


Fig. 1.45. Sindecanul

Structura componentei proteice este diversă. Joncțiunea dintre cele două porțiuni, peptidică și glucidică, se face de regulă printr-o legătură O-glicozidică. Aminoacidul de legătură face parte dintr-o secvență repetitivă serină-glicină. Pe o catenă proteică miez se pot atașa una sau mai multe catene glicozaminoglicanice.

Proteoglicanii se găsesc fie sub formă solubilă, fie sub formă integral membranară.

Funcțiile îndeplinite de proteoglicani sunt bazate pe capacitatea lor de a atașa componente cationice, hidrofile, inclusiv structuri particulare, recunoscute de secvențe specifice din componenta proteică.

Sindecanul (*Fig.1.45.*), de exemplu este format dintr-o catenă oligopeptidică ce străbate stratul dublu lipidic al membranei plasmatice. Porțiunea citosolică interacționează cu filamentele de *actină*, elemente constitutive ale citoscheletului, iar cea extracitosolică se atașează de *fibronectină*, o proteină existentă în matrixul extracelular. Prin aceasta sindecanul ancorează celulele de matrixul extracelular. Astfel de interacțiuni mai permit legarea reciprocă a celulelor, precum și atașarea de celulă a unor biocompuși diferiți.

Proprietățile vâscoelastice conferite de prezența componentelor glicozaminoglicanice sunt bazate pe asocierea moleculelor de apă la structurile proteoglicanice odată cu structuri cationice. Agregatele rezultate, de mare volum și mică densitate pot acționa atât ca lubrefianți

cât și ca medii de circulație pentru diferite substanțe hidrofile. Datorită acestor însușiri proteoglicanii sunt întâlniți în special în țesutul conjunctiv. Componenta glucidică este majoritară (95%).

Dintre glicozaminoglicanii cunoscuți o figură aparte o face **acidul hialuronic**[**GlcA**(β1,3)**GlcNAc**(β1,4)]$_n$. Acesta este singurul reprezentant neasociat covalent cu vreo componentă proteică.

Se găsește în agregate de dimensiuni ridicate și se asociază cu alți proteoglicani, cu conținut majoritar de acid condroitin sulfuric (vezi mai departe).

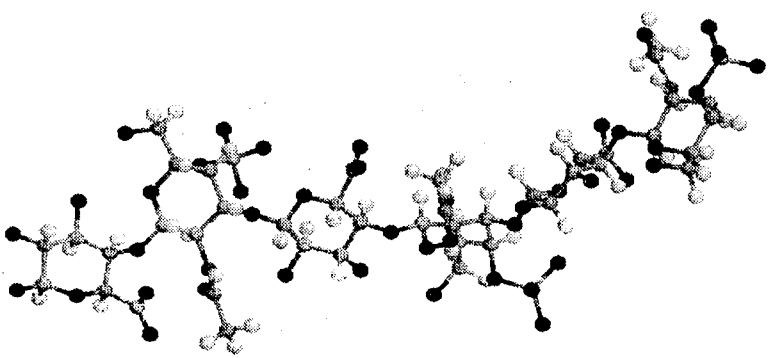


Fig. 1. 46. Porțiune din molecula de condroitin sulfat

Acidul hialuronic, se găsește în cartilagii, umoarea vitroasă, cordon ombilical, lichid sinovial, dermă etc. Constituie o barieră împotriva germenilor patogeni. Este hidrolizat de *hialuronidază*, o enzimă care este produsă de unele bacterii, de veninul unor șerpi, se găsește în lipitoare, în lichidul spermatic. În cartilaj se găsește asociat cu condroitin sulfații și keratan sulfații.

Condroitin sulfatul, [**GlcA**(β1,3)**GalNAc**6(4)SO_3H(β1,4)]$_n$, *Fig.1.46.* Galactoza poate fi sulfatată fie în poziția 4 (condroitin 4-sulfatul) fie în poziția 6(condroitin 6-sulfatul). Găsindu-se preponderent în cartilagii, datorită grupărilor puternic acide, contribuie pe lângă proprietățile vâscoelastice la mineralizarea și homeostazia minerală a matrixului osos și cartilaginos. (*Fig. 1.48.*)

Keratan sulfatul [**GalA**(β1,4)**GlcNAc**6SO3H(β1,3)]$_n$ (*Fig.1.47.*). Are, după cum se observă o structură asemănătoare cu a condroitin sulfatului.

Structura acestui proteoglican include un filament central de acid hialuronic, de care sunt legate necovalent la intervale de aproximativ 30 nm filamente proteice miez. Numărul acestor filamente per catenă de

hialuronat este de cca. 140. Întreg complexul are o masă de aproximativ $2 \cdot 10^6$ D și o lungime de aproximativ 2–4 μm. De acestea sunt atașate resturi de condroitin sulfat și de keratan sulfat, de data aceasta cu legături covalente.

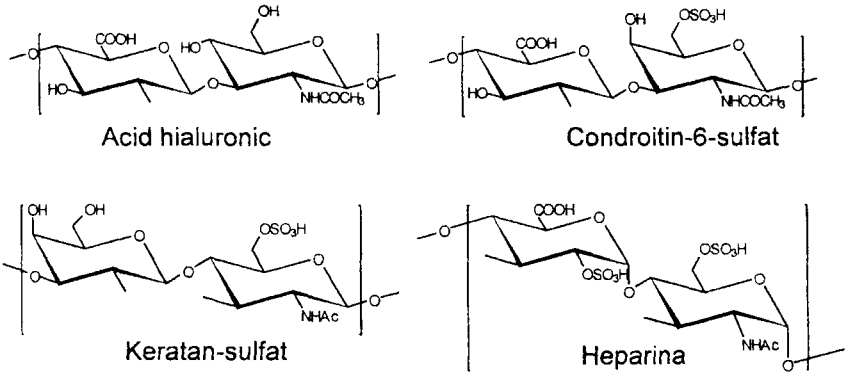


Fig. 1. 47. Unitățile glicozaminoglicanice ale unor proteoglicani importanți

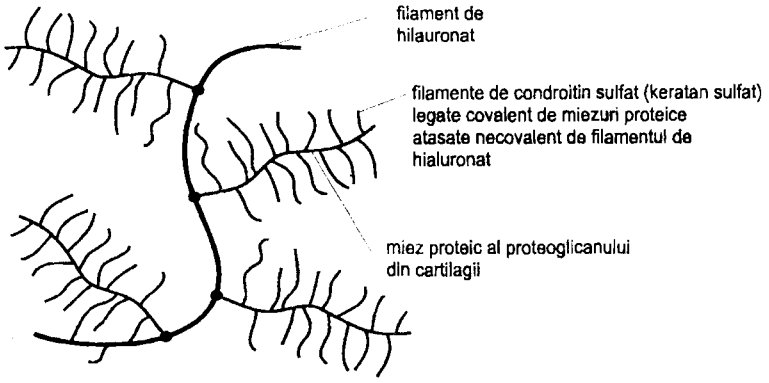

filament de hilauronat
filamente de condroitin sulfat (keratan sulfat) legate covalent de miezuri proteice atasate necovalent de filamentul de hialuronat
miez proteic al proteoglicanului din cartilagii

Fig. 1. 48. Structura unui proteoglican din cartilagii

Un alt exemplu este **heparina**,

$[\mathbf{GlcA}2SO_3H(\alpha 1,4)\mathbf{GlcNAc}6SO_3H(\alpha 1,4)]_n$ (*Fig.1.47.*) sau

$[\mathbf{IdA}2SO_3H(\alpha 1,4)\mathbf{GlcNAc}6SO_3H(\alpha 1,4)]^a{}_n$

o poliglucidă sintetizată la nivelul pulmonului și al ficatului. Posedă funcție anticoagulantă, care este asigurată prin interacțiunea cu trombоplastina, care la rândul ei inhibă acțiunea trombinei, o proteină care produce coagularea sangvină.

[a] Id A acid iduronic - epimerul 5 al acidului glucuronic

1.5.1.3. Peptidoglicani (poliglucidele conjugate ale pereților celulelor bacteriene)

Bacteriile sunt printre cele mai primitive forme de viață. Interiorul celulei are o presiune osmotică ridicată și adeseori fluctuantă. Stabilitatea celulară este asigurată de existența pe lângă membranele dublu lipidice a unor pereți rigizi.

Natura chimică a acestora este polipeptidio-poliglucidică, substanțele respective fiind cunoscute sub numele de peptidoglicani. Bazat pe coloratia Gram (cristal violet) bacteriile se clasifică în Gram pozitive și Gram negative[4]. Structura peptidoglicanilor este diferită în funcție de această clasificare. Astfel bacteriile Gram pozitive au un perete gros, de aproximativ 25 μm, format din mai multe straturi peptidoglicanice, care se găsesc deasupra membranei celulare dublu lipidice.

Bacteriile Gram negative posedă un perete subțire, de aprox. 2–3 μm, format dintr-un singur strat peptidoglucanic, dispus între două straturi dublu lipidice membranare. În ambele cazuri peptidoglucanul este numit și *mureină* (latinul *murus* = perete). Scheletul peretelui este un polimer (β–1,4) format dintr-o succesiune alternantă de N-acetilglucozamină și acid N-acetilmuramic, similară celulozei. Acest polimer este reticulat la nivelul carboxilului restului de acid lactic, prin atașarea unei tetrapeptide care în majoritatea cazurilor are structura L-Alanil·D-i-Glutamil·L-Lisil·D-Alanil. Gruparea ε-NH_2 a lisinei se leagă de carboxilatul D-alaninei unei tetrapeptide adiacente, aparținând altei catene (*Fig.1.50.*). La celulele Gram negative legarea se face direct, iar la cele Gram pozitive legarea se face prin intermediul unei secvențe pentaglicinice (*Fig.1.49.*).

În interiorul structurii pereților celulari se găsesc formațiuni glicolipidoproteice.

În cazul *bacteriilor Gram negative* cca. 10 % dintre resturile de D-alanină sunt înlocuite cu acid diaminopimelic care realizează joncțiuni cu secvențe proteice hidrofobe care străbat membrana celulară externă realizând ancorarea stratului peptidoglicanic. Pe lângă aceste structuri, peretele celulelor Gram negative mai conține substanțe lipoproteice care străbat ambele membrane, realizând o rigidizare suplimentară a peretelui celular. Catenele lipoproteice și glicoproteice, cu o secvență particulară depășesc de multe ori membrana externă.

---

[4] bacteriile care atașeaza stabil colorantul (acesta rezistă la spălare) se numesc Gram pozitive, fată de cele care nu atașează stabil colorantul (Gram negative)

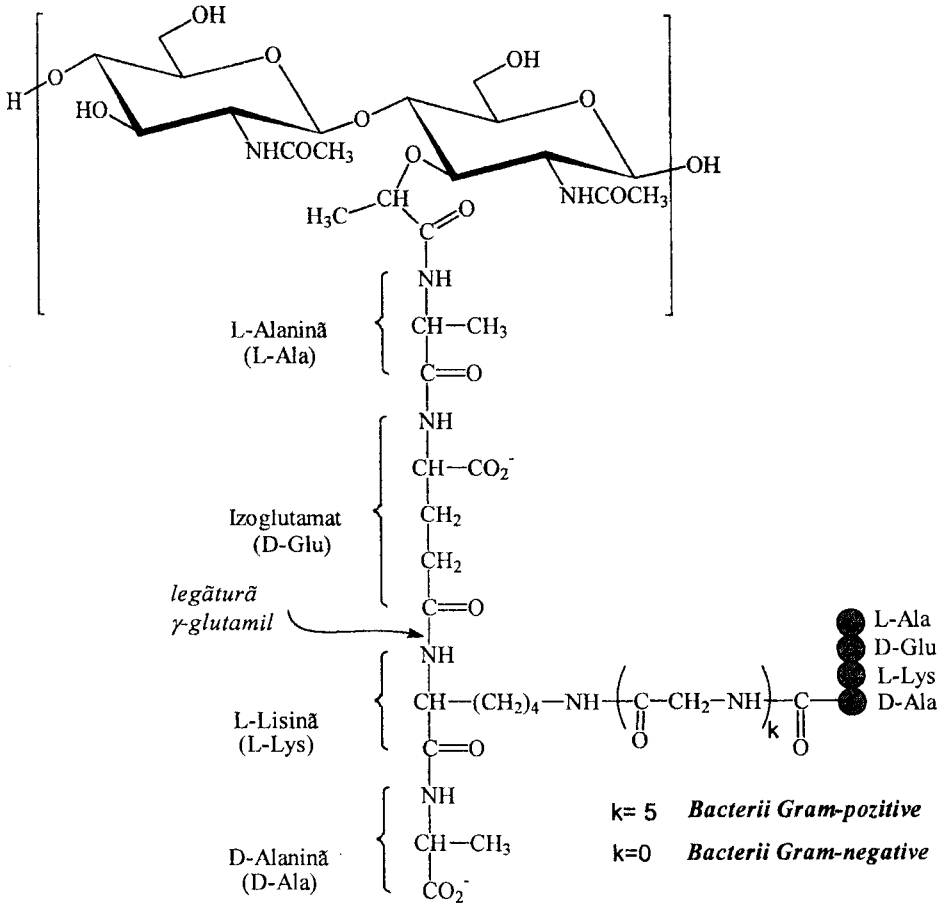


Fig. 1.49. Structura peptidoglicanilor din pereţii bacterieni

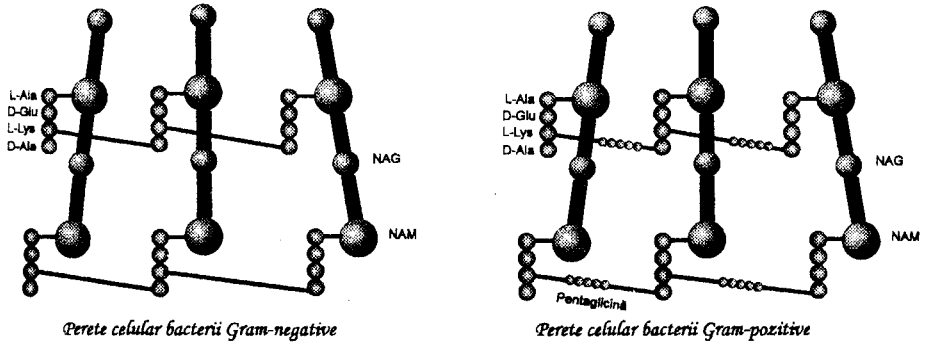


Fig. 1. 50. Modelele structurii monostraturilor peptidiglicanice la bacteriile Gram pozitive şi Gram negative

Prin secvența monomerică specifică, are loc interacțiunea cu alte structuri de pe suprafața altor celule sau din spațiul extracelular înconjurător.

Suprafața bacteriilor gram negative este acoperită de o mulțime de catene poliglucidice care sunt ancorate în startul lipidic extern, printr-o componentă lipidică. Aceste formațiuni sunt denumite **lipopoliglucide** sau **lipopolizaharide**. Diversitatea lungimii și a secvenței glucidice particularizează celulele, constituind veritabile etichete de individualizare, recunoscute ca atare de mediu, de alte celule asemănătoare sau nu. În ultimul caz lipopoliglucidele acționează ca determinanți antigenici[5] (vezi secțiunea legată de anticorpi), permițând organismului superior invadat recunoașterea celulelor bacteriene ca agenți străini (nonself). Această recunoaștere este realizată de către sistemul imunitar care totodată declanșează răspunsul imun care duce la neutralizarea prin mijloace specifice a specii invadante.

În cazul *bacteriilor Gram pozitive*, peretele peptidoglicanic, mai gros decât la bacteriile Gram negative, dar fără membrana externă, conține structuri oligomerice de **acizi teichoici** legate covalent (*Fig.1.51*). Acești compuși sunt produși de policondensare ai glicerofosfatului sau ribitolfosfatului. Joncțiunea dintre monomeri se realizează prin legături de tip fosfodiesteric de tipul acelora dintre nucleotide.

Grupele hidroxil ale resturilor de glicerofosfat sau ribitolfosfat sunt foarte adesea utilizate în legături O-glicozidice cu mono- sau di-glucide din care cel mai ades întâlnite sunt Glc și GlcNac. Uneori D-alanina esterifică acești hidroxili. Acizii teichoici posedă de multe ori antigenicitate, servind și ca receptori pentru bacteriofagi.

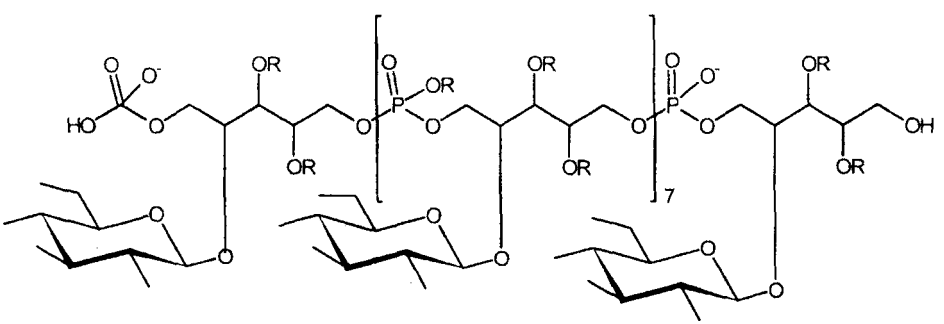


Fig. 1.51. Structura de principiu a acizilor teichoici

[5] secvențe specifice de care se vor lega anticorpii

CAPITOLUL 2. Lipide

Alături de glucide, protide și acizii nucleici, lipidele sunt substanțele fundamentale ale lumii vii. Rolul lor este structural, intrând în compoziția membranelor celulare și ale organitelor celulare, mediind transportul selectiv al substanțelor prin aceste membrane. De asemenea au un rol energetic important, fiind substanțele de rezervă cu cel mai mare conținut energetic pe unitatea de masă.

Sunt în general solubile în solvenții aprotici, cu diferențieri între clase. Solubilitatea în solvenții protici este limitată.

Chimic, în majoritatea lor sunt esteri ai acizilor grași cu diferiți alcooli (lipide simple – vezi în continuare), putând avea însă și alte tipuri de legături între diferite componente.

2.1. Clasificarea lipidelor

Se poate face după mai multe criterii, dată fiind diversitatea structurală, implicit a proprietăților (*Fig. 2.1*).

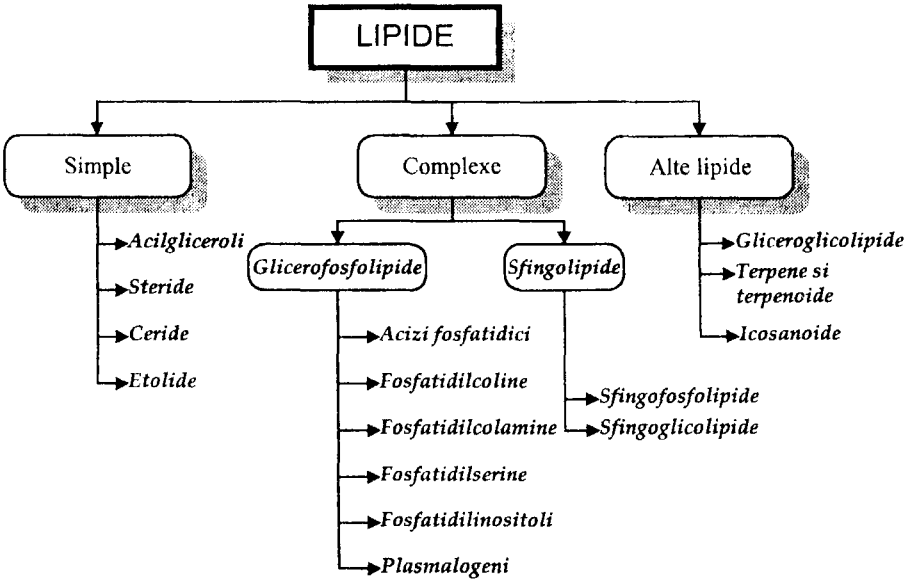


Fig. 2. 1. Clasificarea lipidelor

2.2. Lipide simple

Pe lângă faptul că posedă doar elementele C,H și O, lipidele simple sunt exclusiv esteri ai acizilor grași cu diferiți alcooli.

2.2.1. Acilgliceroli

Sunt substanțe organice de origine naturală, esteri ai glicerinei cu acizii grași. Pentru denumirea acestei clase se folosește adesea termenul sinonim de **gliceride**. Sunt constituenții principali ai grăsimilor și uleiurilor naturale. De notat diferența între grăsimi și uleiuri, primele fiind semisolide la temperatura camerei în timp ce celelalte sunt lichide. Sunt insolubile în apă, dar solubile în solvenți lipofili. Se găsesc atât în regnul vegetal cât și în cel animal, îndeplinind funcția principală de substanțe de rezervă.

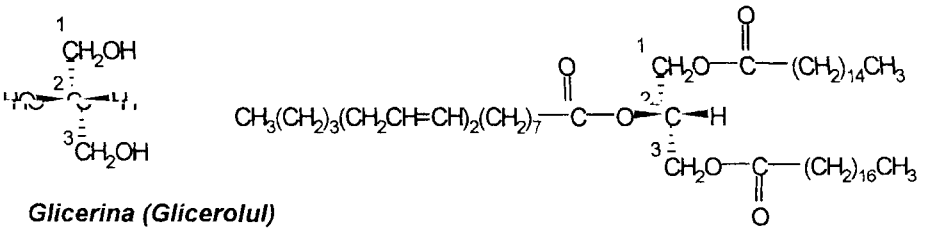
Sistematizarea gliceridelor se poate face după natura acizilor grași care esterifică grupările hidroxil ale glicerinei:

- acilgliceroli **simpli** care conțin același acid gras și acilgliceroli **micști** cu acizi grași diferiți. Majoritatea gliceridelor naturale sunt mixte.
- acilgliceroli **saturați**, respectiv **nesaturați**
- după numărul grupelor hidroxil esterificate distingem: **mono-, di- și triacilgliceroli**. Deoarece majoritatea gliceridelor sunt triacilgliceroli, iar acestea constituie masa principală a grăsimilor, termenul de grăsime este utilizat în sens sinonim cu cel de trigliceridă sau triacilglicerol. Mono- și di-gliceridele apar ca intermediari metabolici. Numărul trigliceridelor este aparent mare. Totuși datorită abundenței mari a acizilor palmitic, stearic, oleic și linoleic și numărul trigliceridelor poate fi limitat (ceilalți acizi grași formând acilgliceroli rari). Gliceridele mixte prezintă activitate optică în cazul în care carbonul central este chiral. De exemplu cu trei acizi grași se pot forma 18 perechi enantiomorfe (36 de specii moleculare distincte).

Pentru a rezolva problema nomenclaturii gliceridelor mixte, care în trecut era limitată la pozițiile α și β, care desemnau hidroxilii secundari respectiv primari, Comisia IUPAC-IUB pentru Nomenclatură Biochimică a introdus sistemul stereospecific de numerotare („stereospecific numbering system"). În concordanță cu acesta, „carbonul din capătul superior al catenei glicerolului, când aceasta este reprezentată în proiecție Fischer, cu hidroxilul secundar în stânga, este notat C–1". Pentru a fi diferențiat de alte sisteme de numerotare se utilizează prefixul „sn"

atașat termenului glicerol. (de la stereospecific numbering). Exemplul 1-palmitil–2-linoleil–3stearil-sn-glicerolului este convingător (*Fig.2.2.*).

Gliceridele se pot altera prin păstrare, în urma unor procese hidrolitice și oxidative. Susceptibilitatea la alterare crește odată cu gradul de nesaturare. Legată de nesaturare este sicativitatea, proprietatea unor uleiuri (de natură gliceridică) de a forma pelicule în prezența oxigenului atmosferic.



Glicerina (Glicerolul) cu atomii de carbon numerotati după sistemul "sn"

1-palmitil-2-linoleil-3-stearil-sn-glicerol

Fig. 2. 2. Structura și stereochimia acilglicerolilor

În natură, gliceridele se găsesc sub formă de amestecuri. Caracterizarea expeditivă a calității acestora se poate face cu ajutorul unor indicatori: Ia, Is și Ii. **Indicele de aciditate** (Ia) este definit ca masa de KOH (mg) care neutralizează un gram de grăsime la rece. Este o măsură a gradului de prospețime al grăsimii brute, determinând acizii grași liberi, proveniți desigur prin hidroliza gliceridelor. **Indicele de saponificare** (Is) este definit ca masa de KOH care neutralizează la cald (reflux) un gram de grăsime. Se referă la toți acizii grași conținuți în probă inclusiv cei din gliceride, care sunt eliberați hidrolitic. Este corelat invers cu masa molară a acestora. **Indicele de iod** (Ii), este definit ca masa de iod (g) care reacționează cu 100 g de grăsime. Este direct corelat cu gradul de nesaturare al grăsimii.

2.2.2. Steride

Sunt esterii sterolilor cu acizii grași. Sterolii derivă de la nucleul ciclopentanperhidrofenantrenic de bază al gonanului (*Fig.2.3.*).

Dintre derivații gonanului se pot aminti următoarele structuri de bază des întîlnite în lumea vie (*Fig.2.4*).

În cazul compușilor naturali, configurația relativă a ciclurilor B/C și C/D este trans, în timp ce ciclurile A/B pot fi în poziție trans (forme numite α), respectiv în cis (forme numite β). (*Fig.2.5.*) Poziția cis, res-

pectiv trans se estimează după poziția relativă a protonilor legați de C–5 respectiv C–10. în cazul trans: axial-axial, iar în cazul cis: axial-ecuatorial.

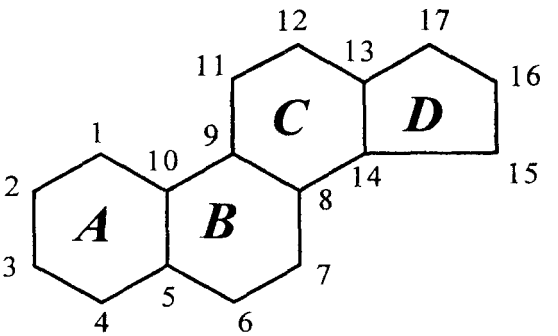


Fig. 2. 3. Gonanul

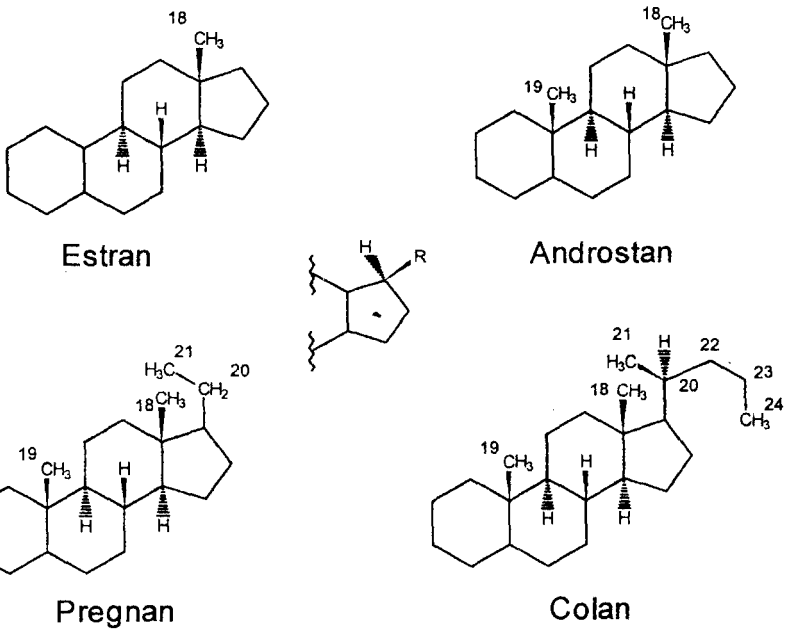
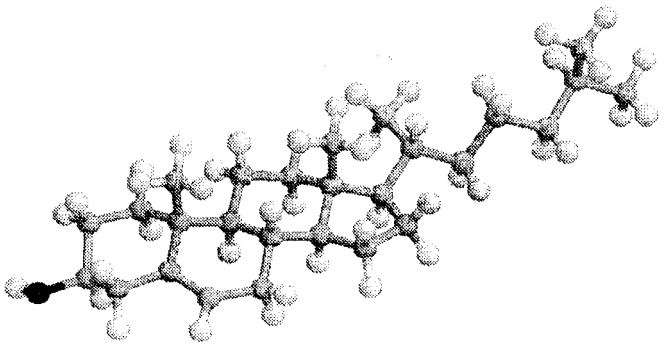


Fig. 2. 4. Structuri steranice întâlnite la hormoni și acizi biliari



Sterolii posedă cel puțin o grupare hidroxil localizată în majoritatea cazurilor la C–3. Aceasta este esterificată cu acizi grași.

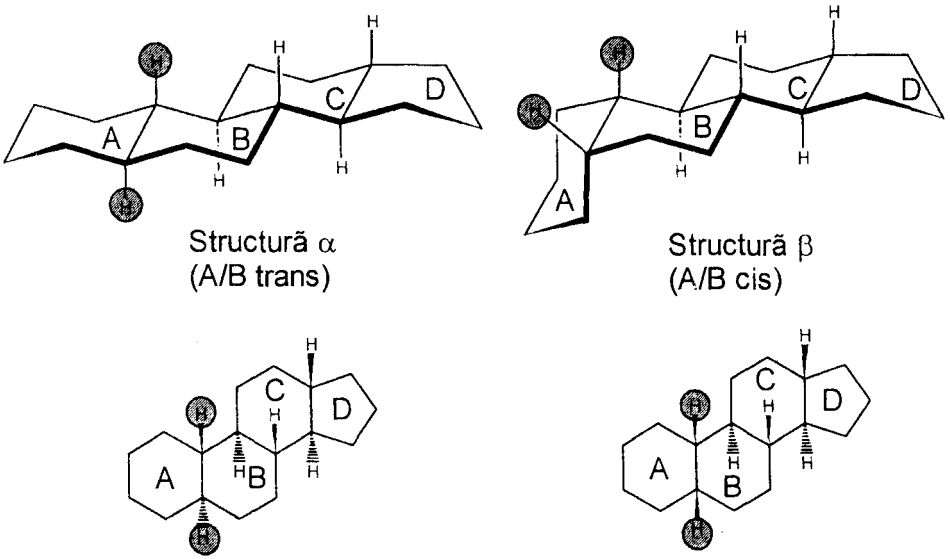
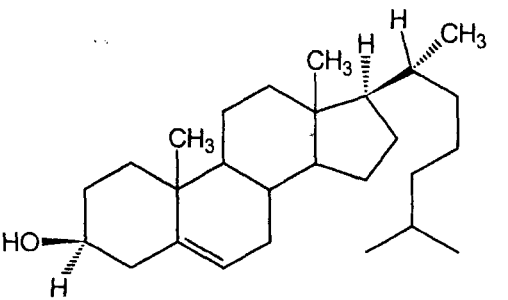


Fig. 2. 5. Configurații ale nucleului gonanic

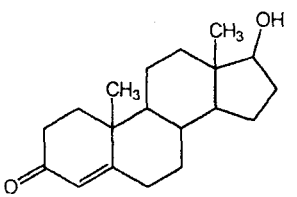
Dintre sterolii mai comuni se poate menționa colesterolul (*Fig. 2.6.*), care este unul dintre cei mai importanți steroli existenți în organismul animal. Pe lângă faptul că este un constituent important al membranelor plasmatice și al organitelor celulare, colesterolul este precursorul tuturor steroizilor animali.



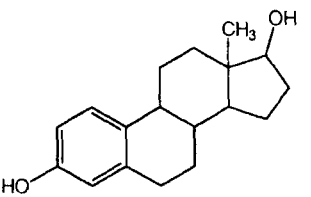
Colesterol
(5-colesten-3β-ol)

Fig. 2.6. Formula și modelul structural al colesterolului

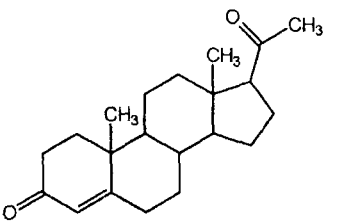
Rigiditatea relativă a structurii ciclopentan-perhidrofenantrenice, precum și slaba polaritate a grupării 3-hidroxilice, au consecințe asupra proprietăților membranelor, în punctele care acestea îl conțin, contribuind la reducerea mobilității zonale. Colesterolul este un component al complexelor lipoproteice din sânge și intră în constituția plăcilor care apar în ateroscleroză. De asemenea colesterolul participă la reglarea permeabilității eritrocite, la emulsionarea grăsimilor la nivelul intestinului.



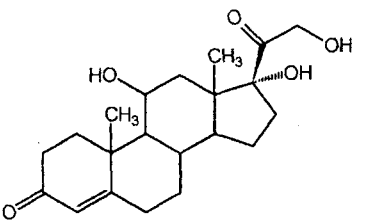
Testosteron



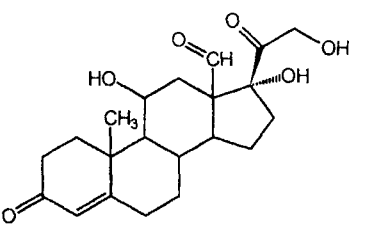
Estradiol



Progesteron



Cortisol



Aldosteron

Fig. 2. 7 Hormoni steroidici

Hormonii steroizi, *Fig.2.7.* nu intră propriu zis în clasa lipidelor dar datorită nucleului steroidic îi vom aminti în această parte: ei se pot sistematiza în androgeni, estrogeni, progestativi, gluco- și mineralo- corticoizi.

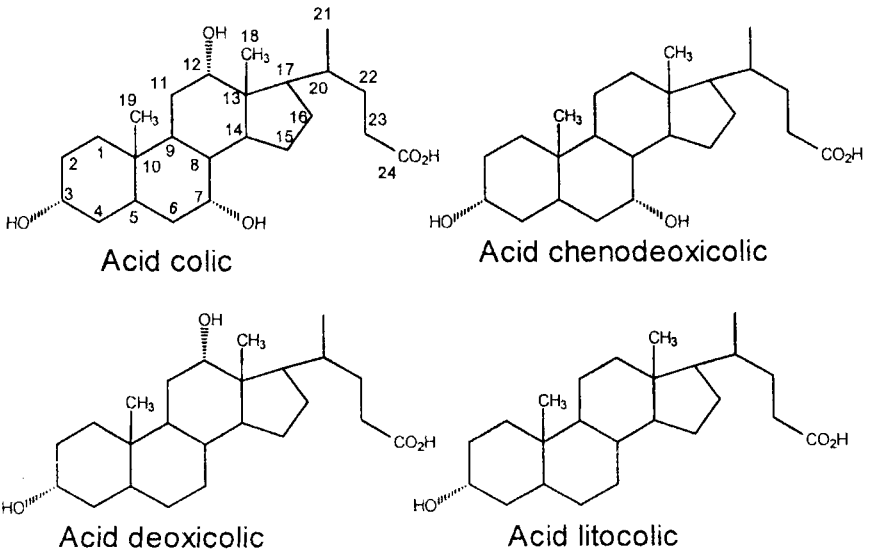


Fig. 2. 8 Acizi biliari (colici)

Hormonii androgeni precum testosteronul și cei estrogeni precum estradiolul mediază dezvoltarea caracterelor sexuale și reglează funcția sexuală. Hormonii progestativi precum progesteronul reglează cronobiologia ovulației. Hormonii glucocorticoizi precum cortisolul participă la reglarea de ansamblu a metabolismului glucidelor, lipdelor și protidelor, în timp ce mineralcorticoizii precum aldosteronul reglează bilanțurile ionice ale H^+, Na^+, K^+ și Cl^-.

O altă clasă importantă de steroizi tot nelipidici o constituie acizii biliari (*Fig.2.8.*). Aceste substanțe, sintetizate în ficat sunt secretate de către vezica biliară în intestin.

Acizii biliari (colici) au proprietăți tensioactive, contribuind prin emulsionarea grăsimilor la transportul transmebranar al acestora în circulația portală și de acolo la nivelul ficatului, unde are loc metabolizarea lor. Emulsionarea grăsimilor se face practic de conjugați ai acizilor biliari fie cu glicina (când se formează de exemplu acidul glicocolic) sau cu taurina (acidul taurocolic). (*Fig.2.10.*)

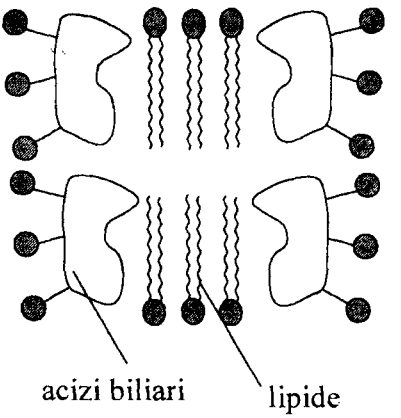


Fig. 2. 9 Structura micelară creeată de acizii biliari cu lipidele

Aceste substanţe posedă pe lângă o funcţie acidă şi o funcţie amidică. Aceasta va forma o legătură amidică la nivelul carboxilului din acidul colic respectiv. Prin ionizarea funcţiilor acide rezultă grupe puternic hidrofile care vor fi orientate către mediu, în timp ce porţiunile hidrofobe (lipofile) ale nucleului steroidic vor fi orientate către globula de grăsime formându-se astfel structura micelară (*Fig.2.9.*).

Glicocolul Taurina

Fig. 2. 10. Substanţe care se ataşează amidic de acizii colici

2.2.3. Ceride

Aceste substanţe intră în componenţa cerurilor, alături de hidrocarburi, alcooli, dioli, acizi, hidroxiacizi. Ceridele sunt esteri ai unor alcooli graşi cu acizii graşi. Numele le vine de la consistenţa ceroasă a acestor substanţe. Sunt întâlnite atât în regnul animal cât şi cel vegetal. La animale menţionăm: **ceara de albine** care conţine în principal palmitat de miricil (C16 - C30), ceara de balenă, spermanceti al cărui component majoritar este palmitatul de cetil (C16-C16), **lanolina** care este un amestec complex de ceride dar şi de alcooli graşi şi lanosterol - un alt tip de sterol. La plante, ceridele se întâlnesc pe suprafaţa fructelor, a frunzelor şi au un rol de protecţie atât împotriva umidităţii, prin hidrofobicizarea suprafeţelor, cât şi împotriva insectelor.

2.2.4. Etolide

Au o răspândire exclusiv vegetală, fiind găsite în cantități ridicate în cerurile coniferelor. Provin din hidroxiacizi prin dubla esterificare a câte două molecule (*Fig.2.11.*). Cel mai adesea în compoziția etolidelor se întâlnesc ω-hidroxiacizi. Se menționează acidul sabinic (ω-hidroxilauric $HO-(CH_2)_{11}-CO_2H$), acidul iuniperic (ω-hidroxipalmitic $HO-(CH_2)_{15}-CO_2H$). Se cunosc și etolide la a căror formare contribuie mai mult de doi hidroxialcooli. Oricum, structura ciclică este este o caracteristică esențială a acestei clase.

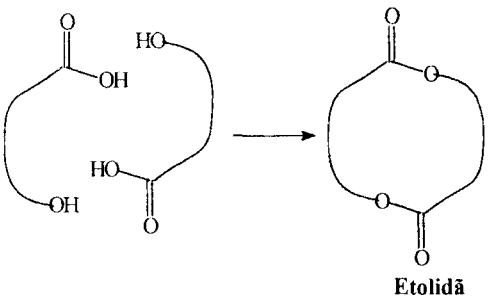


Fig. 2. 11. Formarea etolidelor

2.3. Lipide complexe

Lipidele complexe reprezintă o clasă de substanțe cu mai mult de trei tipuri de atomi în moleculă. Majoritatea conțin acid fosforic, legat fosfoesteric, mai rar fosfoanhidridic de alte molecule.

2.3.1. Fosfatide

Sunt componentele majore ale membranelor celulare. Ca termeni sinonimi se utilizează: glicerolfosfatide, fosfogliceride sau glicerofosfolipide. Sunt substanțe greu cristalizabile, solubile în solvenții aprotici, cu excepția acetonei, care îi precipită. Sunt insolubile în apă cu care pot forma emulsii. Sunt mai reactive decât acilglicerolii. Caracteristica esențială este participarea la structura acestor substanțe a glicerolului, a acidului fosforic, a acizilor grași și opțional a altor componente.

2.3.1.1. Acizi fosfatidici

Grupul acestor substanțe, cel mai simplu structural din clasă, posedă structura de bază a tuturor fosfogliceridelor fiind precursorii acestora. (*Fig.2.12.*) Sărurile (fosfatidații) alcaline, de amoniu, calciu și magneziu sunt solubile în apă. În constituția lor intră preponderent acizii palmitic, stearic, oleic, linoleic și

linolenic. Au fost identificați în cantitate apreciabilă în plante și bacterii. Derivați ai acizilor fosfatidici, formați din două unități de acid

fosfatidic şi una de glicerol, sunt cunoscuţi sub numele de cardiolipide (cardiolipine), după locul unde au fost izolate prima dată (miocard). (*Fig.2.13.*) Sunt folosite în unele reacţii serologice (Reacţia Bordet - Wassermann).

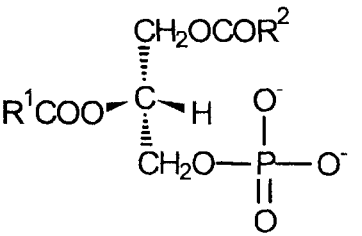


Fig. 2. 12. Fosfatidat

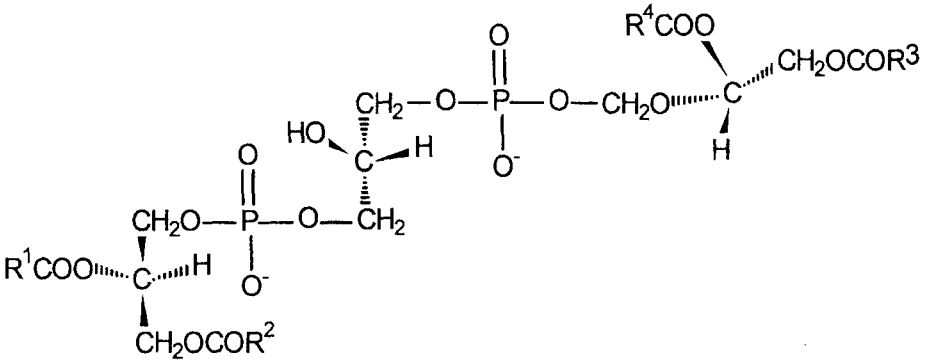


Fig. 2. 13. Cardiolipină (cardiolipidă)

2.3.1.2. Colinfosfolipide

Termeni sinonimi: lecitine, fosfatidilcoline, colinfosfatide. Sunt substanţe amfionice, datorită prezenţei atât a restului acid al acidului fosforic cât şi sarcinii pozitive la atomul de azot al betainei 2-aminoetanolului (colina) (*Fig.2.14.*). Sunt extrem de răspândite, atât în regnul vegetal cât şi în cel animal. Rotesc la dreapta planul lumini polarizate.

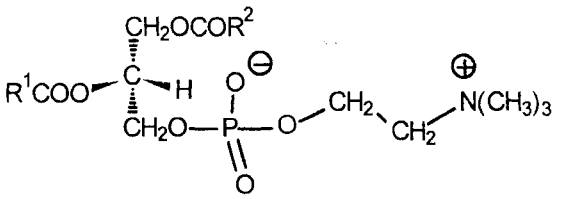


Fig. 2. 14. Lecitine (colinfosfatide)

Extracția lor se bazează pe solubilitatea în etanol și insolubilitatea în acetonă. Sursele cele mai comune sunt gălbenușul de ou și semințele de soia. Posedă patru legături esterice. Scindarea legăturii esterice din poziția 2-(sn) conduce la lizolecitine, compuși extrem de toxici, cu acțiune puternic hemolitică. Lizolecitinazele, prezente în veninul de cobră explică acțiunea mortală a mușcăturii.

2.3.1.3. Colaminfosfolipide.

Sunt asemănătoare structural cu colin-fosfolipidele cu deosebirea că în locul colinei se găsește 2-aminoetanolul (*Fig.2.15.*) (colamina).

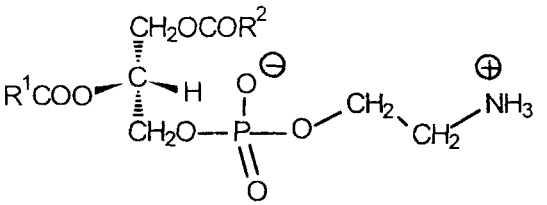


Fig. 2. 15. Cefaline (colaminfosfatide)

Deoarece au fost izolate prima dată din creier au primit numele de cefaline. Însoțesc colinele, dar au o concentrație mai redusă, cu excepția creierului unde predomină.

2.3.1.4. Serinfosfatidele

conțin serina legată fosfoesteric de acidul fosforic. (*Fig.2.16.*) Au fost izolate din creier, din fracțiunea cefalinică. Aici serin-fosfolipidele reprezintă cca 50% din totalul fosfolipidelor, fiind prezente sub formă de săruri de potasiu. Nu au fost identificate însă în gălbenușul de ou. Sunt mai acide decât colinele și cefalinele și au o solubilitate mai redusă în alcool etilic. Intervin în metabolismul intermediar ca donori de acid fosforic.

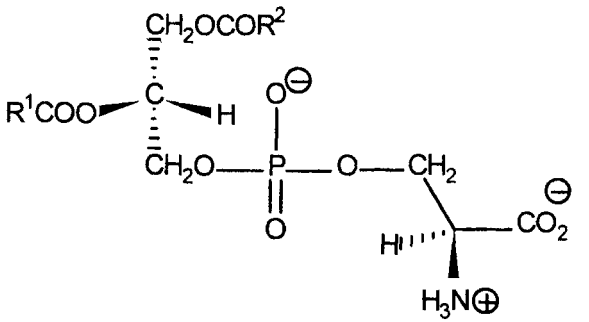
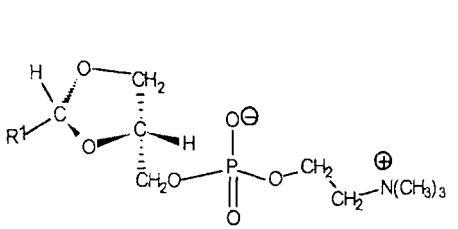


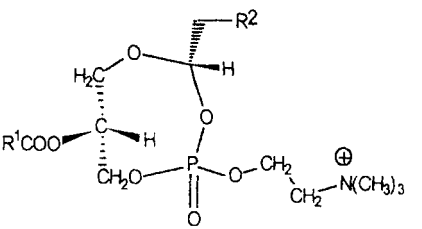
Fig. 2. 16. Serinfosfatide

2.3.1.5. Acetalfosfatidele (plasmalogenii).

Au o structură asemănătoare colaminfosfolipidelor, și mai rar cu a colinfosfolipidelor.

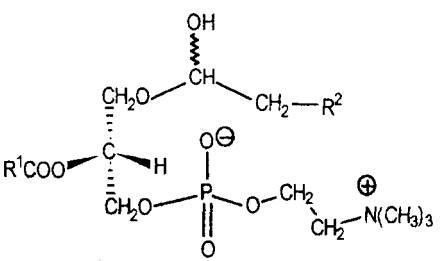


structură acetalică

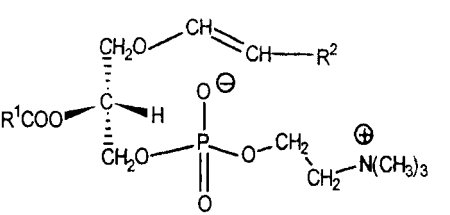


structură acetal-acilalică

Fig. 2. 17. Structuri acetalice și acetal-acilalice ale plasmalogenilor



structură semiacetalică



structură vinileterică

Fig. 2. 18 Structuri semiacetalice și vinileterice ale plasmalogenilor

Diferența constă în faptul că cel puțin o grupare hidroxil din molecula glicerolului este legată semiacetalic de o „aldehidă grasă". Acești

compuși au fost identificați cu ajutorul reactivului Schiff, specific după cum se cunoaște pentru aldehide.

Datorită reactivității structurilor, formele semiacetalice, acetalice, vinileterice și acetal acilalice, (*Fig.2.17.* și *2.18.*) sub care au fost identificate pot fi rezultatul unor transformări ce au loc în decursul extracției, deci artefacturi. Certă rămâne identificarea formelor aledehidice (reduse) ale acizilor grași care explică toate structurile întâlnite.

2.3.1.6. Inositolfosfatidele.

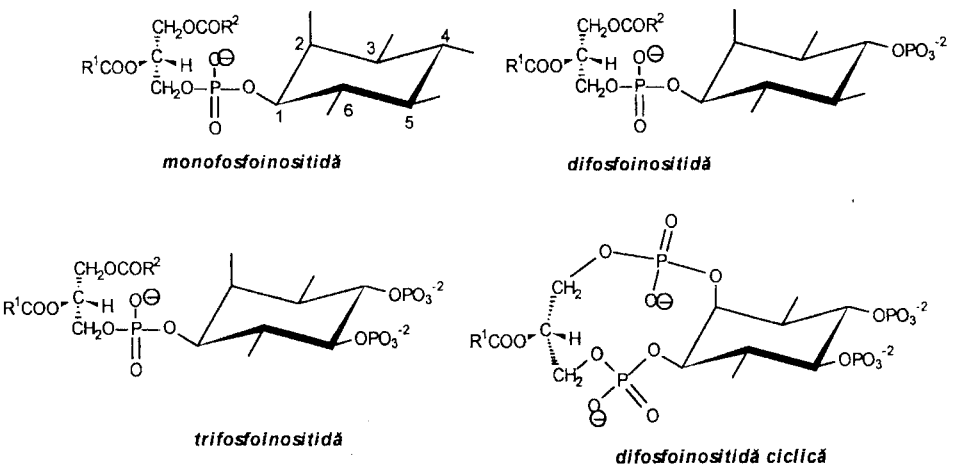


Fig. 2. 19. Inositolfosfatide (fosfoinositide)

Sunt fosfogliceride care conțin de regulă mioinositol alături de glicerol, acid fosforic și acizi grași. Mioinositolul este unul din izomerii inositolilor, care sunt hexitoli ciclici. Acesta posedă un hidroxil axial, restul fiind ecuatoriali. În funcție de numărul resturilor de acid fosforic din molecula acestor substanțe tipurile identificate se sistematizează în inositol monofosfolipide (monofosfoinositide), inositol difosfolipide (difosfoinositide) și inositol trifosfofolipide (trifosfoinositide). De asemenea a fost identificată în creier o fosfatidildifosfoinositidă ciclică, fiecare rest de acid fosforic posedând două legături fosfoesterice și doar un rest acil organic (*Fig.2.19*). Inositolfosfolipidele sunt mai răspândite în regnul vegetal și la bacterii decât în cel animal unde se găsesc în cantități relativ ridicate în creier.

În unele organisme s-au identificat derivați ai inositidelor, care conțin resturi oligoglucidice legate de nucleul inositolic.

2.3.2. Sfingolipide

Sfingolipidele sunt lipide complexe, care în locul glicerolului conțin un aminoalcool numit generic sfingoid, cu o carbocatenă lungă (cel mai adesea de 18 atomi). S-au identificat peste 30 de astfel de aminoalcooli dintre care cei mai comuni sunt D- sfingozina (2-amino-octadec–4-en–1,3-diol), D-sfinganina (dihidrosfingozina) și fitosfingozina (2-amino-octadecan–1,3,4,5 tetrol), (*Fig.2.20*) ultimul fiind găsit în regnul vegetal și la unele microorganisme.

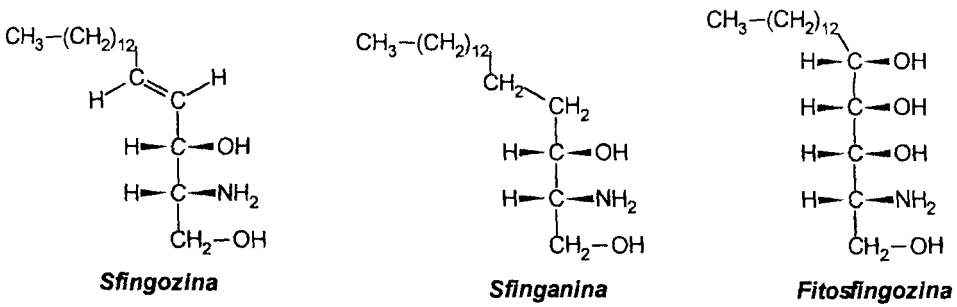


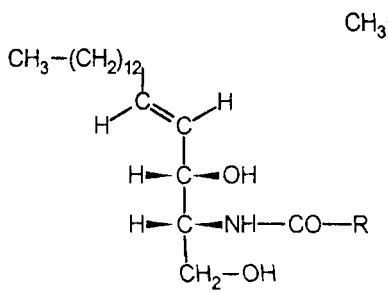
Fig. 2. 20. Sfingoide întâlnite în compoziția sfingolipidelor

Sfingoidele se găsesc sub forma unor amide numite *ceramide*, obținute prin acilarea grupării amino cu diferiți acizi grași dintre care cei mai comuni sunt stearic, lignoceric, nervonic, hidroxinervonic și cerebronic. Ceramidele reprezintă de fapt precursorii tuturor sfingolipidelor.

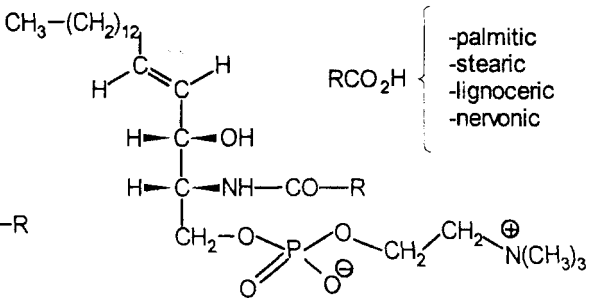
Ceramidele se găsesc destul de puțin răspândite în organisme (concentrații reduse în ficatul, splina și pulmonul animalelor), ele fiind de regulă obținute prin hidroliza menajată a sfingofosfolipidelor. Se poate face deci o analogie cu acizii fosfatidici, considerați ca structuri de bază ale glicerofosfolipidelor.

2.3.2.1. Sfingofosfolipidele

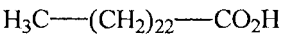
Sfingofosfolipidele conțin în moleculă o ceramidă, un rest fosforic legat la hidroxilul din poziția 1 și un rest de colină (la sfingomieline) sau unul de colamină legate fosfoesteric. Cele mai răspândite sunt sfingomielinele. Cele din substanța cenușie a creierului conțin cantități ridicate de acid stearic. Alți acizi grași prezenți în moleculele de sfingomielină sunt acidul palmitic (C16), lignoceric, nervonic (*Fig.2.21*).



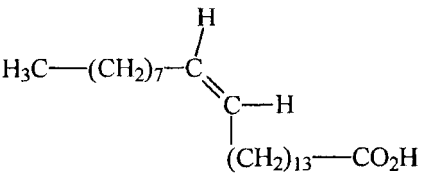
Ceramida



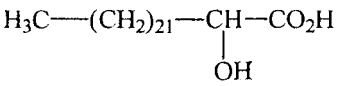
Sfingofosfolipide (Sfingomieline)



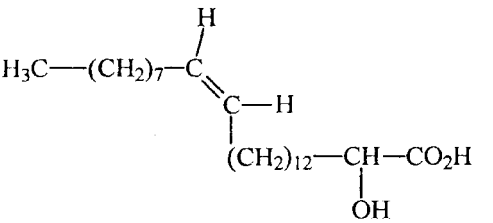
Acid lignoceric (C24)



Acid nervonic (Δ^{15} lignoceric)



Acid cerebronic (C24-α-OH)



Acid α-hidroxinervonic

Fig. 2. 21 Ceramida ca precursor şi sfingomielinele

2.3.2.2. Sfingoglicolipidele

Sfingoglicolipidele diferă de sfingofosfolipide prin faptul că atomul C–1 al ceramidei este legat o-glicozidic de o monoglucidă (cerebrozidele şi sulfatidele sau oligoglucidă (gangliozidele).

Cerebrozidele, au fost identificate în regnul animal. În poziţia C–1 ele posedă un rest de β-D glucoză sau β-D galactoză. Primele se găsesc în splină şi mucoasa intestinală, celelalte doar în creier. După natura acidului gras legat amidic de structura de bază aminoalcoolică, distingem *cerazine, cerebrone, nervone şi oxinervone. (Fig.2.22)*

Din structură reiese că cerebrozidele nu posedă grupări ionizabile. Toate cerebrozidele sunt greu cristalizabile, de regulă prezentându-se

ca o masă ceroasă, solubile în cloroform, acid acetic (precauție la transamidare !), piridină și insolubile în apă, etanol rece, eter etilic și eter de petrol.

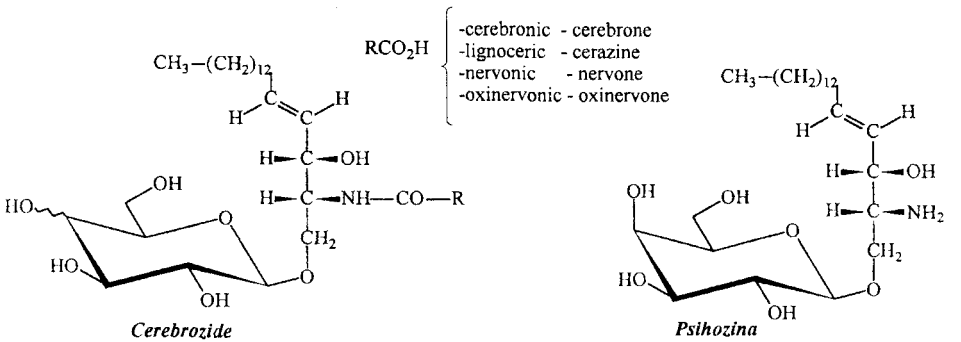


Fig. 2. 22

Prin hidroliza legăturii amidice, din galactocerebrozida sfingozinei de obține *psihozina*, un intermediar în biosinteza galactocerebrozidei (*Fig.2.22*).

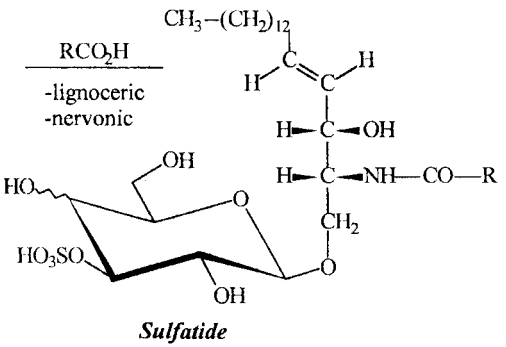
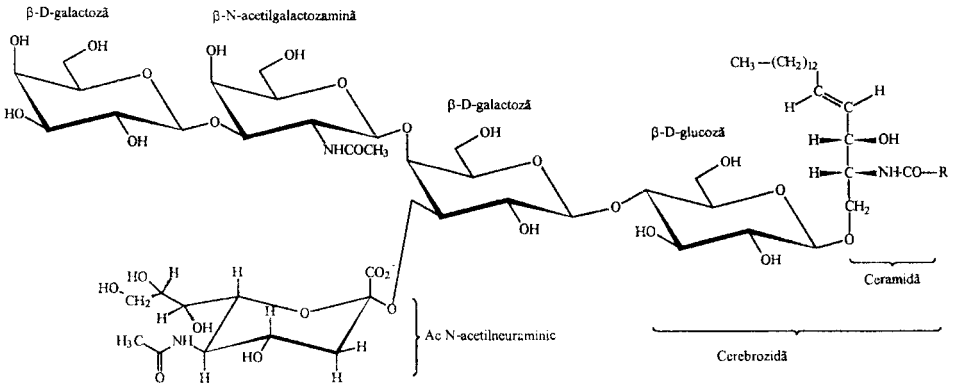


Fig. 2. 23

Sulfatidele sunt derivați sulfatați ai cerebrozidelor (*Fig. 2.23*). Au fost identificate în creier, în porțiunea medulară a suprarenalelor. Resturile de acil cel mai adesea întâlnite în structura sulfatidelor din mamifere sunt cel mai adesea provenite de la acizii nervonic și lignoceric și mai rar acizii oleic, stearic și palmitic.

Gangliozidele au structură asemămătoare cerebrozidelor, cu diferența că în structura lor apar oligo sau poliglucide care conțin N-acetilgalcatozamină (NAG), N-acetilneuraminat (NAM) galactoză și glucoză (*Fig.2.24*). Glucoza este în majoritatea cazurilor legată de restul ceramidic printr-o legătură β-glicozidică. Compoziția lor este destul de complexă, componenta glucidică putând conține până la 100 de unități monoglucidice. O altă caracteristică este absența sau concentrația extrem de redusă a acizilor grași nesaturați din componența unității ceramidice. Prezența resturilor sialice în molecula gangliozidelor le conferă caracteristici (poli)anionice și evident puternic hidrofile la pH-ul fiziologic.

În ciuda faptului că se găsesc în cantități foarte reduse în membranele celulare, glicosfingolipidele prezente la suprafața celulei determină funcții importante precum recunoașterea celulară și imunitatea tisulară. Gangliozidele se găsesc cu precădere în terminațiile celulei nervoase fiind implicate direct în transmisia impulsurilor nervoase.



Gangliozidă

Fig. 2. 24

Atât glicerofosfolipidele cât și sfingolipidele au o structură amfipatică formată dintr-o zonă (cap) hidrofilă, și două cozi hidrofobe (*Fig.2.25*). Acest tip de structură se orientează în orice mediu, cu porțiunile care prezintă similaritate către acel mediu.

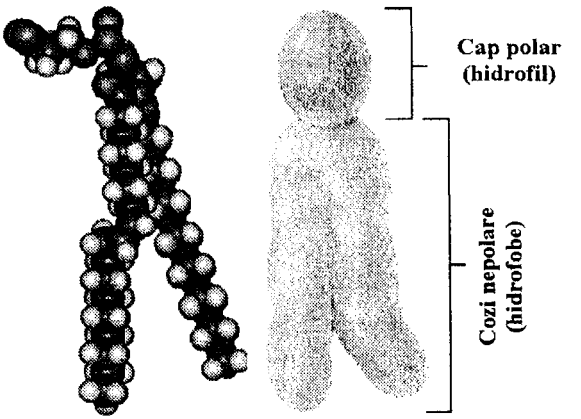


Fig. 2. 25. Modelul amfipatic al fosfolipidelor membranare exemplificat pe o colaminfosfatidă

2.4. Alte lipide

Există o serie de alte substanţe care nu intră în categoria lipidelor simple sau complexe. Dintre acestea vom aminti glicozilglicerolii, terpenele şi icosanoizii.

2.4.1. Glicozilgliceroli

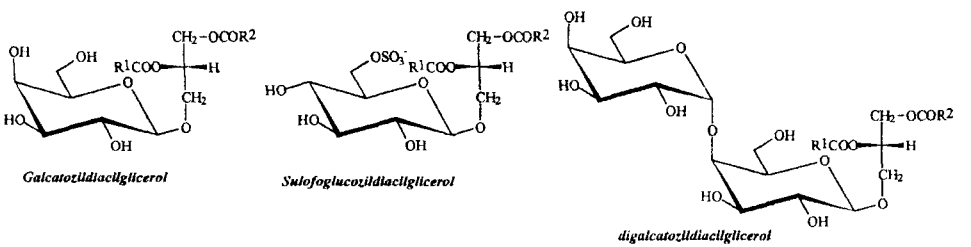


Fig. 2. 26. Glicozilgliceroli neutri şi acizi (sulfataţi)

Vom aminti monoglicozilacilglicerolii, sulfomonoglicozilacilglicerolii şi diglicozildiacil glicerolii (*Fig.2.26*).

2.4.2. Terpene şi terpenoide

Reprezintă o clasă de substanţe extrem de răspândite în lumea vegetală, dar prezente totuşi în cantităţi apreciabile şi în lumea animală. Solubilitatea redusă precum şi participarea unora la constituţia straturilor bilipidice le plasează în categoria lipidelor. Termenul de **terpenă** se utilizează pentru a desemna o substanţă formată dintr-un multiplu întreg de 5 atomi de carbon, iar cea de **terpenoidă**, desemnează o substanţă cu număr diferit de multiplu de cinci al atomilor de carbon, dar care, metabolic provine dintr-o terpenă.

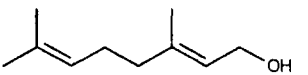
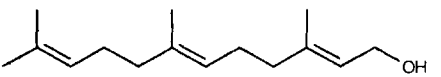
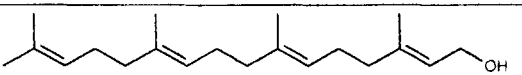
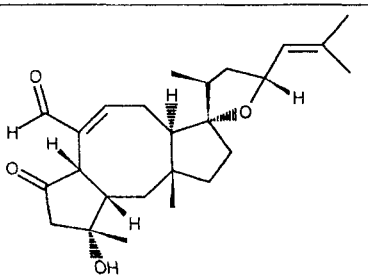
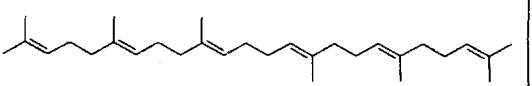
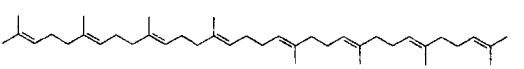
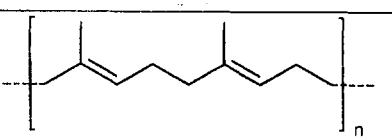
Unitatea de cinci atomi de carbon este **izoprenul** (2-metil–1,3-butadiena). Repetarea prin di- tri-... merizare a izoprenului (notat de multe ori ip) duce la formarea familiilor de terpene şi de aici, a celor de terpenoide. Joncţiunea dintre două unităţi de izopren se face coadă-cap (ipip) sau coadă-coadă (ippi).[6] De notat că terpenele sunt în cele mai multe cazuri forme modificate chimic (oxidate, reduse etc.) ale produşilor de oligomerizare ai izoprenului.

[6] Prin cap desemnăm extremitatea ramificată a catenei izoprenice.

Cu excepția hemiterpenelor, sesterpenelor și a cauciucului natural, foarte adesea celelalte terpene apar sub formă de esteri pirofosforici ca intermediari în procese metabolice.

Clasificarea terpenelor se face după numărul unităților izoprenice din structura compusului (*Tab.2.1*):

Tab. 2.1. Clasificarea terpenelor

Tip	Nr. de atomi de carbon	Exemple	
		structură	nume
Hemiterpene	5		izopren
Monoterpene	10		geraniol
Sescviter-pene	15		farnesol
Diterpene	20		Geranil-geraniol
Sesterterpene	25		Ofiobo-lina A
Triterpene	30		Scualen
Tetraterpene	40		Fitoen
Politerpene			Cauciuc nautral

Hemiterpenele

Termenul de bază, izoprenul se găsește liber în concentrații extrem de reduse. Tot așa se găsesc și derivații Δ^2- și Δ^3- izopentenilpirofosfat.

Monoterpenele

Conțin două unități izoprenice (10 atomi de carbon). Se găsesc în special în plantele superioare, reprezentanții lor fiind utilizați datorită mirosului lor în industria de parfumerie. In plantă se găsesc în formațiuni secretorii, de unde pot fi recuperate prin diferite metode (antrenare cu vapori de apă sau extracție cu grăsimi – (tehnica *enfleurage* utilizată în parfumerie de secole în Franța)-, sub formă de uleiuri esențiale.

Sescviterpenele

Reprezintă cel mai divers grup de terpene atât ca număr de specii, cât și ca structură, în prezent fiind cunoscute cca. 200 de carboschelete sescviterpenice. Se găsesc de regulă asociate cu monoterpenele

Diterpenele

Și acest grup este numeros. Dintre cei peste 500 de reprezentanți cunoscuți o notă aparte o fac giberelinele, substanțe cu funcție fitohormonală.

Sesterterpene

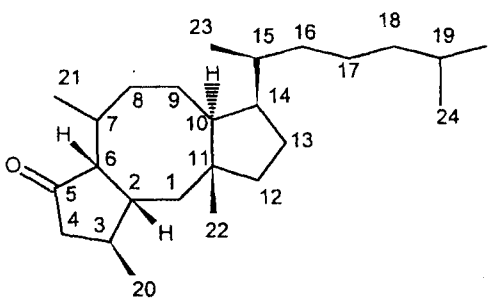


Fig. 2. 27. Ofiobolanul

Conțin 25 de atomi de carbon, deci cinci unități izoprenice. Cei mai cunoscuți reprezentanți sunt cei din familia *ofiobolanului* al căror termen parental este prezentat în (*Fig.2.27.*). Acești compuși au fost identificați în fungi. Ofiobolanul A, un exemplu al acestei familii, este prezentat în *Tab.2.1.* Se mai cunosc încă cinci grupe de termeni.

Triterpenele și triterpenoizii

Sterolii sunt triterpenoizii cei mai cunoscuți ai acestei clase. Au fost prezentați la lipidele simple.

Tetraterpenele

Cei mai importanți reprezentanți sunt cele cca. 500 de carotenoide cunoscute până în prezent. Datorită sistemului de duble legături conjugate acești pigmenți sunt colorați. Se găsesc atât în organismul animal dar mai ales în cel vegetal. Aici, în cloroplast, formațiunea infracelulară unde se găsesc, ei joacă atât rolul de pigment fotosensibil, implicat în fototransmisia semnalului luminos cât și de substanță antioxidantă. În organismul animal, carotenoidele, în special cele de tip hidrocarburic, numite caroteni, joacă rolul de provitamină A (vezi vitaminele)

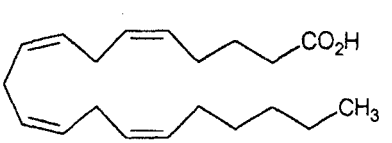
2.4.3. Icosanoizi

Sunt o clasă de substanțe lipidice derivate din glicerofosfolipide care posedă la 2-(sn) atașat un rest arahidonil. Caracteristica acestui grup de substanțe este că au 20 de atomi de carbon, de unde și numele (icosanul este n-alcanul cu 20 atomi de carbon). Acțiunea icosanoizilor constă în medierea proceselor inflamatorii, reglarea transmiterii impulsurilor nervoase, reglarea agregării trombocitare, stimularea contracției musculaturii netede etc. Funcția hormonală a icosanoizilor este locală, ei acționând în concentrații extrem de scăzute și doar aproape de locul sintezei datorită duratei lor de viață reduse, de ordinul secundelor eventual al minutelor.

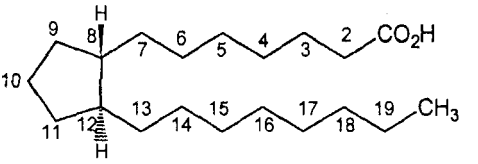
Substanța de origine a biosintezei lor este acidul arahidonic (acidul icosa–5,8.11,14 tetraenoic). (*Fig.2.28*) În stare liberă, concentrația acidului arahidonic este neglijabilă. Din glicerofosfolipidele care îl conțin, el poate fi eliberat în două modalități. În primul caz, sub acțiunea unei fosfolipaze (fosfolipaza A) se hidrolizează legătura esterică 2-(sn) din fosfatidilcolină. În celalalt caz, observat doar la fosfatidilinositoli, inițial se îndepărtează inositolul, iar apoi din diacilglicerolul rămas, sub acțiunea unei noi lipaze (fosfolipaza C), va fi eliberat restul de acid arahidonic. De menționat că ambele procese se desfășoară sub control hormonal.

Acidul arahidonic poate fi transformat în două moduri care vor determina tipul de icosanoizi care vor fi sintetizați. În primul caz, sub acțiunea prostaglandinendoperoxidsintazei, care conține o componentă ciclooxigenazică și una peroxidatică se vor forma succesiv două prostaglandine particulare, PGG_2 și PGH_2, (*Fig. 2.30.*) de la care vor deriva celelalte prostaglandine și tromboxanii. Cea de-a doua cale, utilizează lipoxigenaza care duce la formarea leucotrienelor.

Prostaglandinele au fost primul tip de astfel de substanțe descoperite. Ele au fost identificate în lichidul seminal, fiind presupus a fi sintetizate de către prostată, și având un efect constrictor asupra miometrului. Ulterior, s-a demonstrat că prostaglandinele se formează practic în toate țesuturile mamiferelor.



Acidul arahidonic

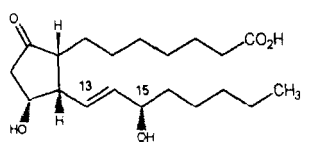


Acidul prostanoic

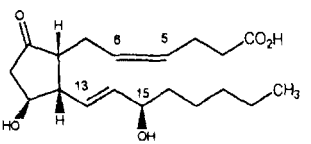
Fig. 2. 28 Structuri de bază ale icosanoidelor

Se cunosc 9 tipuri de prostaglandine codificate cu PGA_i - PGI_i. Toate aceste substanțe derivă de la acidul prostanoic (*Fig.2.28*). Caracteristica lor este prezența unui ciclu ciclopentanic. Indicele semnifică numărul de duble legături neciclice.

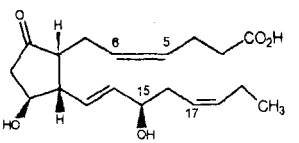
Prostaglandinele E (**PGE**) (*Fig.2.29*) posedă ca element distinctiv prezența unei grupări carbonil la C9 precum și a adouă grupări hidroxil și una (PGE_1), două (PGE_2) sau trei duble legături (PGE_3). Numele le-a fost atribuit de descoperitorii Bergström și Sjövall în 1960 datorită solubilității lor în *e*ter, prin care se deosebesc de prostaglandinele F (**PGF**), solubile în tampon fosfat.



PGE_1



PGE_2



PGE_3

Fig. 2. 29 Prostaglandine F

PGF sunt derivați cu gruparea carbonil din poziția 9 redusă la hidroxil.

După cum noua grupare hidroxil este trans sau cis în raport cu hidrogenul 8, acest tip de prostaglandine primesc numele α, respectiv β.

PGA, PGB și **PGC** sunt produși de eliminare a hidroxilului 11 din **PGE** (*Fig.2.31.*).

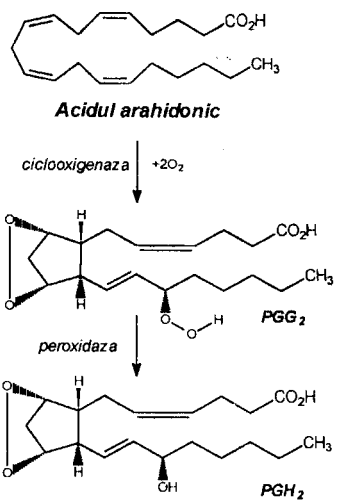


Fig. 2. 30. Transformarea endoperoxid sintazică a acidului arahidonic

PGD diferă de **PGE** prin inversarea OH-ului din poziția 11 cu carbonilul din poziția 9.

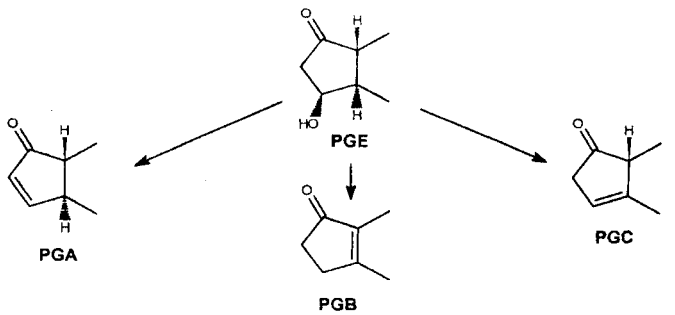


Fig. 2. 31 Formele deshidratate ale prostaglandinelor derivate din PGE

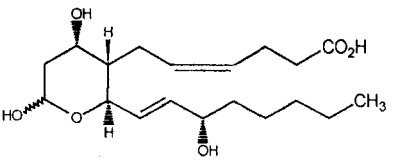


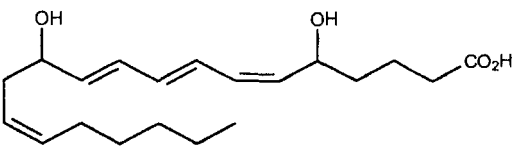
Fig. 2. 32

PGG și PGH sunt peroxizi derivați din **PGF.**

Medicamentele antiinflamatorii (aspirina, indometacinul, ibuprofenul etc.) inhibă acțiunea ciclooxigenazică a prostaglandin endoperoxid sintazei. Mecanismul acestei inhibiții constă în inactivarea prin ace-

tilare (acilare) a unui rest de serină. In acest mod se inhibă sinteza tuturor prostaglandinelor respectiv a tromboxanilor, prin aceasta influențându-se răspunsurile inflamatorii și trombocitare prostaglandin dependente.

În locul ciclului pentanic din prostaglandine, **tromboxanii** (*Fig.2.33.*) au în structura lor un ciclu de șase atomi cu oxigen (ciclu oxanic). Numele le derivă de la acest ciclu și de la directa implicare în agregarea plachetară (formarea trombusului). În plus tromboxanii provoacă vasoconstricție coronariană.



Leucotriena B_4

Fig. 2. 33

Leucotrienele (*Fig.2.33.*) reprezintă cea de-a treia mare clasă de icosanoizi. Numele le derivă de la leucocite, unde au fost descoperite și de la cele trei legături duble conjugate. Ele se formează din acidul arahidonic prin acțiunea lipoxigenazei. Această enzimă nu este afectată de antiinflamatoarele care inhibă prostaglandin endoperoxid sintaza. Caracteristica leucotrienelor este că nu conțin nici un ciclu, fiind doar derivați oxigenați ai acidului arahidonic. Acțiunea lor se manifestă prin creșterea permeabilității vasculare.

2.5. Membrane biologice

2.5.1. Caracteristici generale

Sunt formațiuni de natură lipoproteică care delimitează celulele de mediul exterior, organitele celulare de citosol. Funcționalitatea membranelor, ca rezultat al interacțiunii lipide - proteine nu se limitează doar la separarea sistemelor microbiologice (celulă, organite celulare) ci se manifestă prin realizarea transportului selectiv, prin membrană, recepția unor semnale din mediu, reacții chimice specifice.

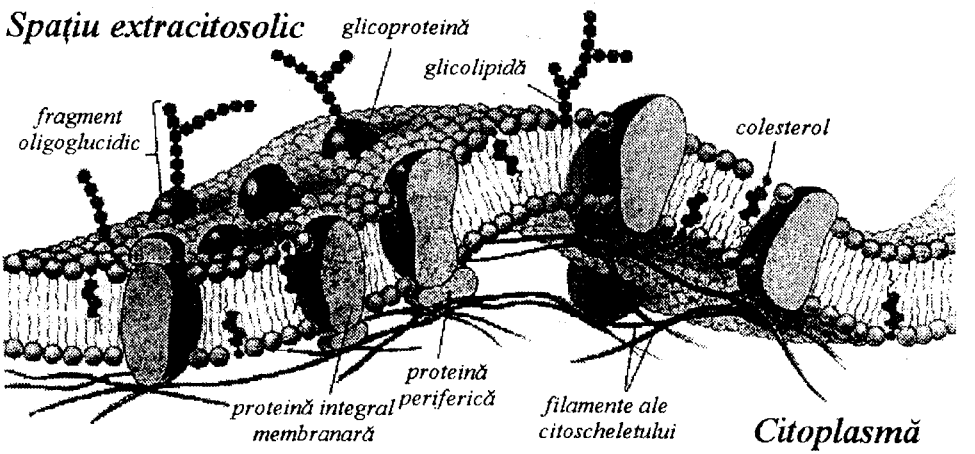


Fig. 2. 34. Structura unui fragment de membrană plasmatică

În pofida diversității funcționale toate membranele biologice posedă o serie de caracteristici generale:

♦ fiecare membrană este un film foarte subțire, format din molecule lipidice și proteice. Integritatea membranei este menținută prin interacțiuni necovalente.

♦ moleculele lipidice sunt aranjate ca un strat dublu lipidic de 5 - 10 nm grosime și reprezintă o barieră relativ impermeabilă pentru trecerea moleculelor hidrosolubile.

♦ membranele sunt structuri mobile, fluide, ca rezultat al interacțiunilor slab energetice între catenele hidrofobe din interiorul stratului dublu lipidic.

♦ membranele au o structură asimetrică regăsită în funcționalitatea diferită pe cele două fețe. Această asimetrie se bazează pe tipurile diferite de lipide și proteine care se găsesc pe ambele fețe membranare.

♦ moleculele proteice inserate în membrană, mediază majoritatea funcțiunilor membranei, transportând specific diferitele substanțe moleculare sau ionice sau catalizând reacții specifice membranei precum sinteza ATP-ului. Raportul masic lipide: proteine este cuprins în plaja 4:1 - 1:4. Există membrane cu conținut majoritar de proteine cum ar fi membrana internă mitocondrială, membrana perinucleară, cea a lizozomilor. Alte membrane au un conținut aproximativ egal al proteinelor și lipidelor cum este cazul membranei mitocondriale externe, a reticulului endoplasmatic, a membranei interne ale bacteriilor Gram-

negative. În fine unele membrane au un conținut lipidic majoritar: membranele aparatului Golgi, teaca mielinică a nervilor etc.

♦ Marea majoritate a membranelor sunt polarizate electric, cu sarcina negativă spre interior (de regulă 60 mV). Această polarizare electrică, efect al asimetriei transversale a distribuției lipidice (vezi mai departe), joacă un rol esențial în transport, conversia chimică de energie și în excitabilitate.

♦ În membranele plasmatice ale celulelor organismelor superioare, se găsesc proteine care asigură legături structurale ce conectează celula cu alte celule.

2.5.2. Straturi dublu lipidice

Constituenții majori ai membranelor celulare sunt ***fosfolipidele.*** Așa după cum s-a arătat la capitolul legat de lipide fosfolipidele sunt substanțe care conțin legături fosfoesterice, în care componenta alcoolică este fie glicerolul, fie sfingozina (mai rar sfinganina și în regnul vegetal fitosfingozina).

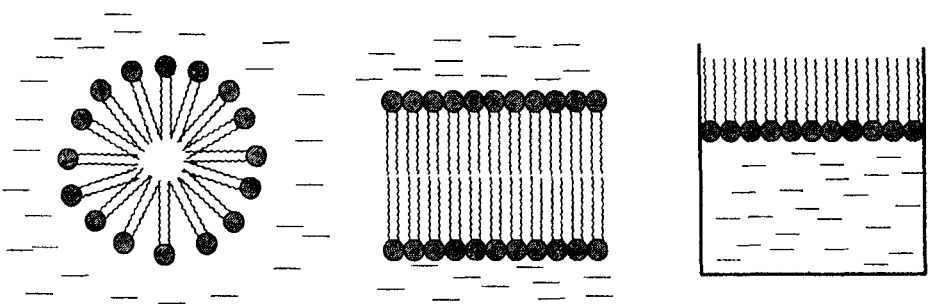


Fig. 2. 35. Structuri rezultate prin agregarea lipidelor într-un mediu hidrofil

Acizii grași care intră în compoziția fosfolipidelor acoperă un domeniu cuprins de regulă între 14 și 24 de atomi de carbon. Acizii grași care intră în structura membranelor celulelor animale *nu sunt ramificați.* Aceștia însă pot fi atât saturați cât și nesaturați. Aproape întotdeauna, dubla legătura are o *configurație cis* și datorită rigidității acesteia, creează o zonă de neomogenitate structurală, cu efecte asupra fluidității membranei. Caracteristic structurii fosfolipidice este existența unei *zone hidrofile,* și a unei *zone hidrofobe* biramificate, (*Fig. 2.35.*) determinată de catenele hidrocarbonate ale resturilor de acizi grași, respectiv de sfingozină. Aceste zone fac din moleculele fosfolipidice *structuri amfipatice,* sau *amfifilice* care le orientează atunci când sunt introduse

într-o soluție apoasă sau uleioasă. (*simili simile gaudet*). Astfel când moleculele lipidice sunt introduse în soluția uleioasă ele se vor orienta cu catenele hidrocarbonate către mediu, iar cele hidrofile către interior. Acesta este totuși un caz întâlnit mai mult în testele experimentale, pentru că mediul extern celulei respectiv citosolul este hidric. La introducerea într-o soluție apoasă, în funcție densitatea lipidelor orientarea se poate face în mai multe moduri: **formarea de micele monostratificate** (aglomerări ordonate cu simetrie sferică, orientate cu partea hidrofilă către exterior - mediu) sau formarea de **straturi (pelicule) dublu-lipidice** atunci când densitatea lipidelor este aproximativ aceeași cu a mediului de dispersie. Datorită lungimii mari a catenelor hidrocarbonate, orientarea spontană, în absența unor forțe de intensificare a omogenizării moleculare are loc de preferință după modelul stratului dublu – lipidic. Atunci când densitatea lipidelor este mai redusă decât a mediului de dispersie se formează monostraturi superficiale orientate cu partea hidrofilă a lipidelor către mediul de dispersie apos.

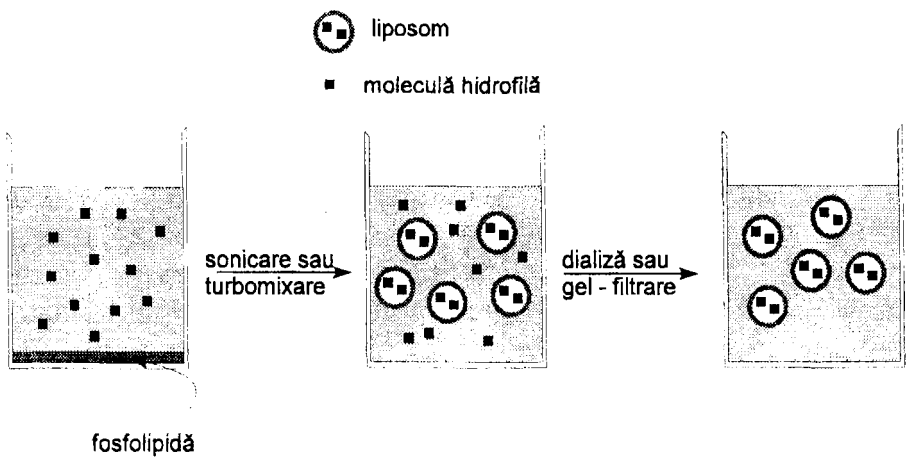


Fig. 2. 36. Formarea liposomilor cu trasori hidrofili incluși

Prin omogenizare intensă precum cea realizată cu turboagitatoare sau prin sonicare, moleculele fosfolipidice introduse într-o soluție apoasă pot forma structuri dublu sau qvadruplu lipidice cu simetrie sferică, care includ în interiorul lor volume variabile de soluție. Astfel de formațiuni artificiale, care prezintă o stabilitate relativ mare sunt cunoscute sub numele de *liposomi* sau *vezicule multilamelare* (*Fig.2.36*).

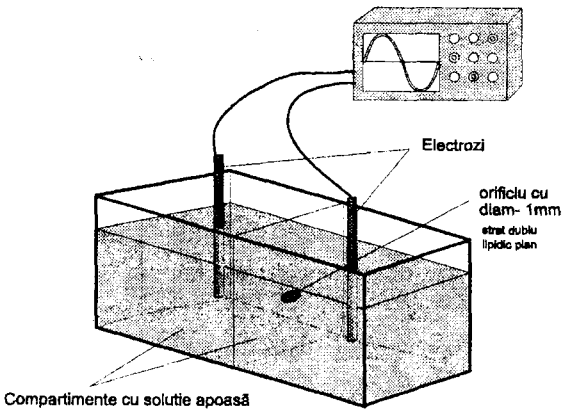


Fig. 2. 37. Model experimental pentru determinarea permeabilității straturilor bilipidice

Liposomii se pot obține și prin introducerea rapidă, printr-un ac de siringă a unei soluții etanolice a unei fosfolipide într-o soluție apoasă. Liposomii astfel obținuți au un diametru de ordinul a 50 mμ. Diametre mai mari, până la 1mm (1000 μm) se pot obține prin evaporarea sub agitare intensă a unei suspensii fosfolipidice apoase.

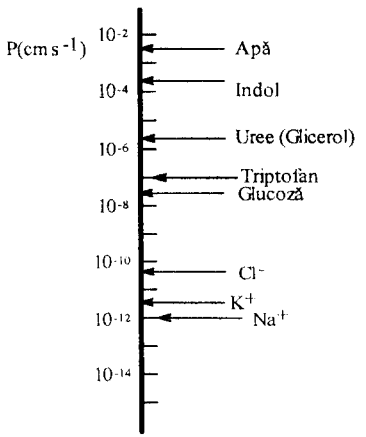
Datorită asemănării acestor agregate artificiale cu membranele biologice naturale liposomii sunt numiți și *membrane negre (black membranes)* într-o analogie nu tocmai fericită cu termenul consacrat de black box atribuit după cum se știe sistemelor cărora nu li se cunoaște decât intrarea și ieșirea, nu și ceea ce se petrece în interior. Liposomii pot fi manipulați fără modificarea structurii, prin gel-filtrare sau dializă. Ei și-au găsit o aplicabilitate practică prin includerea în interiorul acestora a unor substanțe precum enzime, vitamine, agenți dermo-activi. De asemenea liposomii sunt utilizați pentru introducerea în organism a unor substanțe de contrast în procedurile imagistice moderne de diagnostic, precum tomografia computerizată și rezonanța magnetică nucleară.

Datorită similarității structurii cu membranele celulare conținutul liposomilor poate fuziona cu cel al celulelor, creându-se astfel condițiile preliminare pentru eliberarea conținutului liposomilor în celulele țintă.

Tot similaritatea structurală cu membranele celulare fac din liposomi modele experimentale utile pentru studiul permeabilității membranelor naturale.

Astfel pentru dublurile straturi lipidice sferice se stabilește viteza de eliberare a compușilor incluși în liposomi, prin determinarea cantitativă în timp a nivelului acestora într-o anume soluție. O procedură elec-

trometrică de determinare a permeabilității dublurilor straturi lipidice utilizează un vas bicompartimentat. Peretele despărțitor al acestuia are prevăzut un orificiu de cca. 1 mm în diametru. (*Fig.2.37*). Stratul dublu lipidic se formează prin pensulare cu o soluție de fosfolipidă într-un solvent organic. In ambele compartimente se introduce o soluție apoasă. Studiul se poate face măsurând curentul prin circuitul format cu doi electrozi imersați în câte un compartiment, ca răspuns la diferite potențiale aplicate.



Valorile permeabilității pentru diferite specii care traversează stratul dublu lipidic

Fig. 2. 38

Prin astfel de procedee s-a determinat permeabilitatea membranelor dublu lipidice la diferite specii ionice sau moleculare așa după cum se prezintă în *Fig. 2.38.*

Stabilitatea straturilor dublu lipidice, inclusiv a liposomilor se explică prin compensarea scăderii de entropie la formarea acestora de către scăderea de entalpie datorată interacțiunilor nou apărute (legături ionice și de hidrogen între zonele hidrofile ale fosfolipidelor și apa respectiv componenții ionici existenți deliberat în aceasta pe de o parte și interacțiunilor hidrofobe - forțe Van der Waals de dispersie - între catenele hidrocarbonate ale resturilor acil.

2.5.3. Asimetria membranelor plasmatice

Cele două straturi dublu lipidice permit atât lipidelor componente cât și proteinelor integrale sau periferice o circulație practic liberă. Această circulație este realizată prin două tipuri de mișcări: a) o mișcare de **translație** în planul membranei și b) o mișcare de **rotație** în jurul unei axe normale la suprafața membranară. Mobilitatea rezultată în urma acestor mișcări poate fi pusă în evidență prin utilizarea unor proteine membranare marcate fluorescent. Pe lângă aceste două tipuri de mișcări mai sunt posibile și mișcări de rotație în jurul unei axe aflate în planul de separație al celor două monostraturi lipidice ale membranei. Aceste mișcări, cunoscute sub numele de **flip-flop** sunt defavorizate energetic, iar dacă se petrec totuși ele au o viteză redusă, fiind de regulă realizate cu asistență enzimatică. Ponderea redusă a acestor mișcări și energia mare necesară se justifică prin obligativitatea ca extre-

mitatea hidrofilă a componentei care execută mişcarea să traverseze zona hidrofobă din centrul membranei. Acest tip de mişcare frânată împiedică omogenizarea componentelor inserate în membrană pe ambele feţe: internă şi externă. Firesc, asimetria structurală creează premisele asimetriei funcţionale. În *Tab.2.2.* se redă compoziţia celor două straturi ale membranei eritrocitare umane.

Pe lângă asimetria transversală determinată de compoziţia diferită a celor două straturi lipidice mai există şi o asimetrie longitudinală. Aceasta se manifestă prin aspectul de masă mobilă, cu zone diferite ca structură, constituite din asociaţii lipidice, proteice sau lipoproteice. Ionii bivalenţi de exemplu, pot induce separări de fază în membrane formate din fosfatidilserină, fosfatidilcolina sau/şi fosfatidilcolamină prin formarea de asociaţii ale fosfatidilserinelor (punţi saline prin intermediul carboxilaţilor).

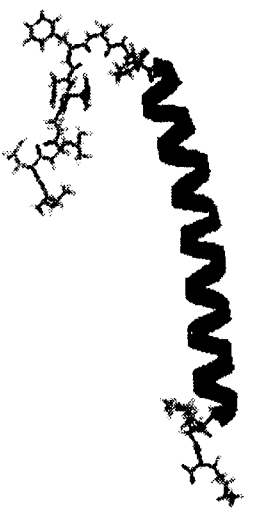


Fig. 2.39. Glicoforina A

De asemenea, anumite proteine membranare pot forma asociaţii cu anumite lipide care creează astfel „insule" mobile într-o mare agitată.

Orientarea proteinelor într-o membrană poate fi determinată prin utilizarea unor enzime proteolitice care nu pot traversa membrana. Carboxipeptidaza, de exemplu este o exoprotează ce hidrolizează legăturile peptidice marginale, aferente capătului C-terminal.

Glicoforina A este un bun exemplu de proteină membranară, constituent majoritar al membranei eritrocitare (*Fig.2.39.*). Numele i-a fost atribuit de către MARCHESI în 1975. Proteina umană conţine 131 de ami-

noacizi dintre care 38 % se situează în porțiunea transmembranară, fiind hidrofobi.

Capătul N-terminal se află în exteriorul celulei, iar cel C-terminal în interior. Porțiunea N-terminală, externă este puternic glicozilată (15 catene oligoglucidice legate O-glicozidic terminate cu acid sialic, și o catenă legată N-glicozidic). Aceste catene sunt deci puternic hidrofilice și anionice. Aceste catene poată determinanții antigenici ai grupelor sangvine, fiind în același timp și receptori pentru virusul gripei.

2.5.4. Distribuția asimetrică a lipidelor

Lipidele prezintă de asemenea o distribuție nesimetrică pe cele două fețe ale membranei plasmatice. În cazul membranei eritrocitare majoritatea fosfatididil etanolaminelor (cefalinelor) și a fosfatidilserinelor se găsesc localizate pe fața internă iar fosfatidilcolinele (lecitinele) și sfingomielinele sunt localizate în special pe fața externă. Această distribuție preferențială influențează pe de o parte distribuția sarcinii electrice pe cele două fețe ale membranei, iar pe de altă parte, permite interacțiuni specifice cu proteine membranare particulare.

Tab. 2.2. Compoziția membranei eritrocitare umane

Component	% masă	*Distribuția procentuală pe fiecare strat*	
		Stratul extern	Stratul intern
Proteine și glicoproteine	55		
Lipide	45		
Fosfolipide	28		
Sfingomieline	6,8	80	20
Fosfatidil coline	7,0	75	25
Fosfatidiletanolamine	7,4	20	80
Fosfatidilserine	4,3	0	100
Fosfoinositide	1,0		
Fosfatidilinositol	0,34		
Fosfatidil diinositol (4-P)	0,22		
Fosfatidil triinositol (4,5-P_2)	0,39		
Colesterol	13	50	50
Glicolipide	3	100	0
Acizi grași	1		

Localizarea diferențiată a lipidelor, pe tipuri, pe cele două fețe ale membranelor, creează asimetria transversală. Localizarea lor se face spontan prin sinteză pe fața de referință, ori dirijat, prin intermediul unor proteine specializate în transferul transmembranar al lipidelor.

Sinteza fosfolipidelor, a glicolipidelor, a colesterolului se realizează de enzime localizate în membranele reticulului endoplasmatic respectiv al aparatului Golgi. Fluxul acestor compuşi către membrane, inclusiv către cea plasmatică este realizat de către proteinele de transfer al lipidelor, mai sus menţionate. Odată stabilită, asimetria transversală a membranelor *se menţine* prin bariera energetică ridicată necesară trecerii lor de pe o faţă pe alta a membranei. În anume condiţii, poate avea loc un transfer al lipidelor de pe o faţă pe alta a membranei plasmatice. Acest transfer se realizează de către proteine specifice numite **flipaze**. De multe ori aceste flipaze necesită asistenţa ATP-ului pentru a realiza transferul lipidic. Aceasta reprezintă o a doua modalitate de menţinere a asimetriei stratului dublu lipidic.

2.5.5. Tranziţii de fază ale straturilor dublu lipidice şi mobilitatea acestora

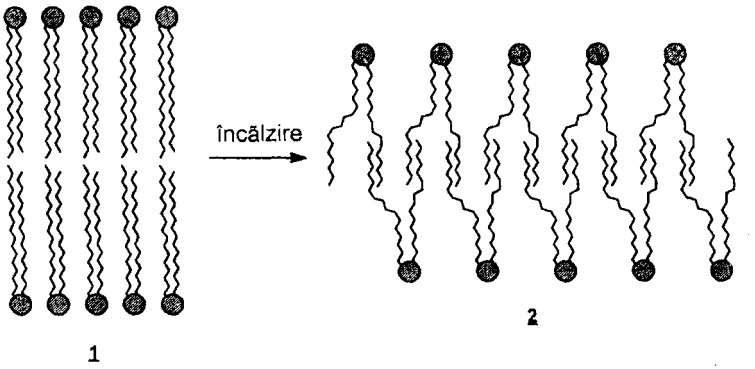


Fig. 2.40. tranziţia de fază suferită de straturile dublu lipidice la modificarea de temperatură

La temperaturi relativ scăzute, mobilitatea carbocatenelor este limitată, energia liberă fiind redusă. Legăturile carbon sunt în conformaţie anti, catenele având lungimea maximă respectiv suprafaţa minimă. În aceste condiţii, grosimea stratului dublu lipidic este maximă, de asemenea şi rigiditatea acestuia. Prin încălzire, creşte mobilitatea catenelor care prin modificări conformaţionale îşi măresc suprafaţa acoperită, dar în acelaşi timp permit întrepătrunderea catenelor opuse (*Fig.2.40.*).

CAPITOLUL 3. Proteine

Dintre cele patru clase de substanțe fundamentale ale materiei vii, proteinele sunt pe departe cele mai importante (în comparație cu glucidele, lipidele și chiar cu acizii nucleici). Natura macromoleculară, nemaiîntâlnita multitudine a structurilor care se regăsește într-o funcționalitate extrem de diversă, le conferă un loc prioritar în raport cu alte substanțe biologice. Termenul de proteine (derivat de la grecescul *proteios* - primul), introdus de către Jöns J. BERZELIUS în 1838, subliniază primordialitatea clasei.

Semnificația celor afirmate este în acord cu funcțiile principale îndeplinite:

1. **Biocataliză enzimatică**. Marea majoritate a reacțiilor petrecute în organismul viu sunt catalizate de macromolecule de natură proteică numite enzime. Domeniul de acțiune al enzimelor se întinde de la cele mai simple reacții precum ar fi hidratarea dioxidului de carbon, catalizată de anhidraza carbonică, și terminând cu cele mai complexe, cum sunt cele implicate în procesele de replicare cromosomială. Valorile specificității și activității enzimelor sunt caracteristici care le departajează net de catalizatorii chimici convenționali, făcându-le competitive în procese de sinteză organică.
2. **Biocataliză hormonală.** În prezent se cunosc o serie de hormoni cu structură polipeptidică care, secretați de celule specializate, își exercită funcția biocatalitică la nivelul celulei țintă, după transportul pe căi umorale. Hormonii nu sunt catalizatori în sensul strict al cuvântului. Prin reglarea nivelului unor anume metaboliți, stări, procese, toate acestea realizate prin controlul unor căi metabolice, hormonii influențează reacțiile chimice, de unde și atributul de biocatalizatori. *Insulina*, hormonul homeostaziei glicemice, *somatostatina* hormonul de reglare a creșterii, *vasopresina*, *angiotensina*, *bradikinina*, *oxitocina* etc. sunt alte exemple de hormoni peptidici.
3. **Transport și stocare.** Proteinele îndeplinesc funcția de transportori specifici pentru diferite molecule sau ioni atât în spațiile intercelulare cât mai ales prin membrane, realizând astfel selectivitatea accesului substanțelor biologic active până în interiorul celulei. *Hemoglobina*, transportorul de oxigen la nivelul eritrocitelor, *mioglobina*, substanța care stochează oxigenul la nivelul celulelor musculare, *transferina*, care transportă ionul feros, depozitându-l în ficat sub formă de complex cu

feritina, o altă proteină, *ceruloplasmina*, purtătorul de cupru, *albumina serică* care transportă lipidele, *citocromii* care asigură transportul electronilor sunt numai câteva dintre reprezentanții proteinelor de transport sau stocare.

4. **Coordonare a mișcărilor**. Natura proteică a formațiunilor contractile ale țesutului muscular, a formațiunilor motile ale flagelilor (cililor) celulelor bacteriene, determină mișcări, ca răspuns la acțiunea unor stimuli de natură diferită.

5. **Suport mecanic al diferitor țesuturi**. Elasticitatea și rezistența pielii este datorată *colagenului*, cea a vaselor sangvine *elastinei*, iar a fanerelor *keratinei*.

6. **Protecția imună**. La apariția substanțelor sau corpurilor străine (virusuri, bacterii) celula reacționează, în funcție de poziția ei pe scara evolutivă, prin sinteza și secreția unor substanțe proteice, anticorpii care neutralizează materialul exogen.

7. **Generarea și transmiterea impulsurilor nervoase.** Răspunsul celulelor nervoase la diferiți stimuli este mediat de o serie de receptori de natură proteică. *Rodopsina*, o cromproteidă, este responsabilă de recepția luminii la nivelul celulelor bastonașe din retină. *Proteinele receptoare* pot reacționa la prezența unor substanțe cu masă moleculară redusă precum acetilcolina și generează semnale la nivelul sinapselor (terminațiilor celulei nervoase), realizând comunicarea între celule.

8. **Controlul creșterii și diferențierii celulare**. Se realizează în strânsă legătură cu determinismul genetic al proteinelor. Transcrierea și traducerea mesajului genetic este coordonată de *proteine represoare*. În organismele superioare *factorii de creștere*, de natură proteică, asigură creșterea și diferențierea celulară. De asemenea, în organismele superioare, activitatea diferitelor celule este coordonată de *hormoni* printre care se disting și cei polipeptidici.

3.1. Clasificarea proteinelor

Din multitudinea de criterii care ar putea fi luate în considerare reținem:

- masa moleculară
- numărul de catene ale proteinei funcționale
- omogenitatea
- solubilitatea și legată de aceasta structura fibrilară sau globulară

Astfel, ***după masa moleculară*** proteinele se pot sistematiza în:

- oligopeptide
- polipeptide
- proteine propriuzise

Distincția dintre cele trei categorii este arbitrară. Se consideră că oligopeptidele conțin până la zece aminoacizi, polipeptidele între zece și 50 de aminoacizi iar proteinele peste această valoare.

Numărul de catene este important pentru proteine deoarece este direct corelat cu complexitatea edificiului proteic. O proteină funcțională poate fi *monomerică* sau poate fi *multimerică.* Proteinele *multimerice* pot fi formate din catene de același fel ca în cazul proteinelor *homomultimerice* sau din catene peptidice diferite ca în cazul proteinelor *heteromultimerice.*

După omogenitate, proteinele se subdivid în:

- *proteine omogene* formate numai din aminoacizi). Acestea se subdivid după forma catenei în *proteine globulare* (diametrul maxim și minim sunt de același ordin de mărime; majoritatea sunt solubile în apă și/sau soluții saline) și în *proteine fibrilare* (diametrul mare poate fi denumit lungime iar diametrul mic poate fi denumit pur și simplu diametru, deci coeficientul de zveltețe sau raportul lungime / diametru este mare). Proteinele fibrilare pot fi *solubile* (fibrinogenul din sânge, respectiv actina și miozina din țesutul muscular) sau insolubile: colagenul, elastina, fibroina, keratinele.

- *proteine neomogene, conjugate* sau *heteroproteide.* Ele sunt formate dintr-o componentă polipeptidică (proteică) numită **apoproteină** și dintr-o componentă neproteică numită **cofactor**. În funcție de natura acestui cofactor distingem:

  - *glicoproteide*[7] (glucide vezi capitolul 1)
  - *nucleoproteide* (acizi nucleici vezi capitolul 5)
  - *lipoproteide* (lipide). Această clasă este reprezentată de conjugați proteici cu lipidele simple ori complexe sau cu produșii lor de hidroliză. Se întâlnesc atât în serul și plasma sangvină cât și în constituția membranelor celulare. Joncțiunea lipidă-proteină se face prin: 1) *legături covalente* (acilarea cu un rest de acid gras a grupărilor aminice sau hidroxil libere din componenta proteică), 2) prin *legături ionice,* (componenta lipidică participă cu resturi fosfat sau amoniu -din colină- iar componenta proteică cu resturi carboxilat ori amoniu, guanidiliu etc).

[7] componentele neproteice se vor specifica între paranteze

Pe lângă acestea, stabilizarea conjugatului lipoproteic se poate face și prin legături mai slabe precum 3) legăturile de *hidrogen*, respectiv 4) forțe *van der Waals*. Lipoproteidele plasmatice se sistematizează după densitate, (corelată aici cu mobilitatea electroforetică) în cinci categorii: chilomicroni, lipoproteide de densitate foarte mică (VLDL[8]), lipoproteide de densitate intermediară (IDL), lipoproteide de densitate mică (LDL) și lipoproteide de densitate mare (HDL).

- *cromoproteide* (pigmenți, coloranți)
- *metaloproteide* (ioni metalici)

Componenta neproteică este un ion metalic. De cele mai multe ori, acest ion metalic apare asociat, în interiorul apoproteinei cu altă structură neproteică, ceea ce face ca multe dintre metaloproteide să aparțină în același timp și altor clase de heteroproteide. Exemplul hemoglobinei (vezi subcapitolul hemoglobină) este edificator. Ionul metalic, care face parte dintre oligo- sau microelemente (Fe, Cu, Zn, Mn. Co, Mo, Ni etc.), se găsește atașat prin legături ionice, fiind de asemenea coordinat de atomi electrodonori.

Rolul componentei metalice este diferit și determină funcționalitatea proteinei. Vom face referință la câteva exemple clasice. În cazul metaloproteidelor care fac parte din **lanțuri transportoare de electroni**, rolul metalului (Cu, Fe) este acela de acceptor de electroni din partea unui component din amonte (în sensul potențialului de reducere), care se va oxida și, succesiv, acela de donor de electroni către un component din aval, care se va reduce. În acest mod funcția transportor de electroni a metaloproteidei se face prin bascularea stării de oxidare (în cazul ferului $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$, în cazul cuprului $Cu^{+} \rightarrow Cu^{2+}$ etc.). În alte metaloproteide rolul metalului este **catalitic**. De regulă metalul acționează prin reducerea densității electronice la un centru de reacție, făcându-l mai susceptibil unui atac nucleofil. (Vezi în Vol.2. exemplul aldolazei de tip II în care oxigenul carbonilic, aflat în vecinătatea ionului Zn^{2+} din enzimă, își va deplasa electronii către ionul metalic, creând astfel o polarizare care va favoriza finalmente clivarea legăturii C3-C4 din esterul Haarden – Young).

Trebuie menționat rolul ferului care apare în două tipuri structurale de metaloproteide: proteidele Fe-heminice și proteidele Fe-S. Din pri-

[8] Acronimele provin din denumirea in limba engleză a acestor compuși *V*ery *L*ow *D*enisty *L*ipoproteins (VLDL), *I*ntermediate *D*ensity *L*ipoproteins (IDL), *L*ow *D*enisty *L*ipoproteins (LDL), *H*igh *D*enisty *L*ipoproteins (HDL),

ma categorie, care are drept caracteristică existența unui nucleu porfirinic (vezi hemoglobina), fac parte substanțe cu funcție catalitică precum catalazele și peroxidazele, apoi substanțe transportoare de electroni precum citocromii (vezi lanțul mitocondrial al transportului de electroni în Vol. II) și proteidele de transport și stocare a oxigenului (vezi hemoglobina și mioglobina). Din cea de-a doua categorie, caracterizată prin existența legăturii covalente Fe-S, fac parte substanțe cu funcție catalitică precum succinat dehidrogenaza și aconitaza, respectiv componente ale lanțului transportor de electroni (vezi lanțul mitocondrial al transportului de electroni și fotosinteza din Vol. II)

♦ *fosfoproteide* (acid fosforic). Conțin grupări fosforice atașate esteric de resturi de serină sau treonină. Exemple de astfel de substanțe sunt **cazeinele** din lapte. Aceste fosfoproteide sunt prezente sub formă de săruri solubile de calciu. Ele nu precipită termic, ci doar prin coborârea pH-ului. Fermentația lactică, prin acidul lactic pus în libertate duce la formarea cazeinei insolubile, din cazeinații solubili existenți în biomasă. Pe acest proces se bazează tehnologiile de fabricare ale brânzeturilor.

După solubilitatea în apă și soluții saline proteinele se împart în:

♦ *proteine insolubile* (scleroproteine): cum sunt de exemplu: colagenul, elastina, fibroina, keratinele.

♦ *proteine globulare* sau *fibrilare solubile* precum: albuminele, globulinele etc.

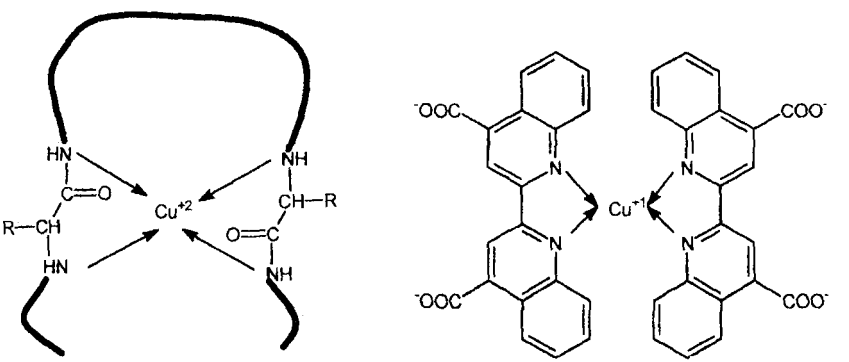
♦ O categorie particulară sunt *proteinele membranare.* Aceste proteine (vezi proteine membranare) sunt structuri amfipatice, porțiunea hidrofobă fiind cea transmembranară. Aceste proteine sunt cunoscute ca proteine insolubile, insolubilitatea acestora fiind însă datorată atașării de membrană. De altfel extracția lor necesită distrugerea membranelor celulare, prin utilizarea detergenților. Proteinele solubile propriuzise (globulare) sunt structuri tridimensionale, care expun pe suprafața externă, în contact cu mediul hidrofil, catene laterale, hidrofile din aminoacizi.

3.2. Conținutul de proteină al materialelor biologice

O procedură comună este ***metoda KJELDAHL***, prin care conținutul de proteină brută din materialul biologic se estimează din determinarea azotului total. Această metodă se bazează pe ipoteza validată că valoarea medie a conținutului de azot din materialul proteic este de 16%, cu

o dispersie relativ scăzută, precum și pe neglijarea conținutului în azot al celorlalți compuși prezenți în probă.

Determinarea realizează transformarea întregii cantități de azot organic în NH_4^+ cu ajutorul acidului sulfuric la fierbere, în prezența unor „catalizatori", în fapt substanțe pentru ridicarea temperaturii de fierbere a amestecului (SeO_2, K_2SO_4), urmată de transformarea cu un exces de NaOH a ionului NH_4^+ în NH_3 și antrenarea acestuia cu vapori într-o soluție titrată de acid clorhidric.



Complex de tip biuret **Complex bicinconinic**

Fig. 3.1. Evidențierea proteinelor prin complexare cu ioni de cupru.

O altă metodă, frecvent utilizată datorită simplității ei este cea a lui ***LOWRY***, care constă în apariția unui complex cupric de tip reacție biuret (*Fig. 3.1.*) și, simultan, a unor forme oxidate la tirozină, la cisteină și la triptofan, prin interacțiunea proteinei cu o soluție alcalinocuprică și cu o soluție fosfowolframică respectiv fosfomolibdenică ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O + Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O + H_3PO_4$). Soluția fosfomolibdowolframică poartă numele de reactiv FOLIN - CIOCÂLTEU. Formele oxidate generează ionul cupros care reacționează cu complexul fosfomolibdowolframic. Complexele cupros și cupric absorb la 660 nm. După incubarea probei proteice, timp de 10 min. la 50°C, proba (cu complexele cupro-cupros formate) se fotometrează la 660 nm față de apă distilată. Etalonarea se face prin utilizarea unor soluții standard de albumină serică bovină, disponibilă comercial. Sensibilitatea metodei este de cca. 10 $mg \cdot l^{-1}$.

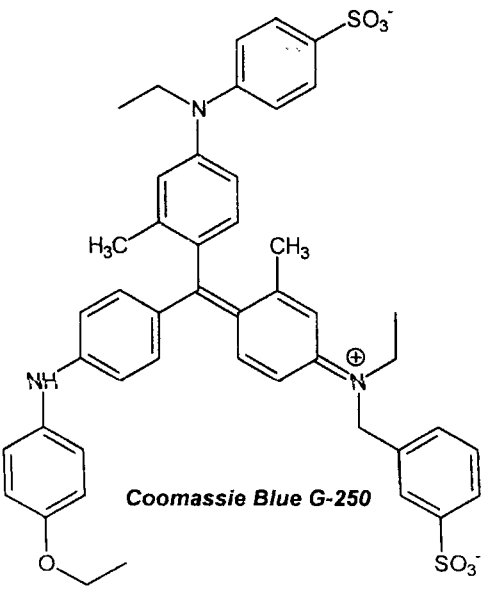


Fig. 3. 2.. Reactivul Coomasie Blue utilizat la determinarea calitativă şi cantitativă a proteinelor prin metoda BRADFORD

O variantă îmbunătățită a metodei Lowry este metoda **acidului bicinconinic** (acid 2,2' bichinolin 4,4' dicarboxilic), care formează un complex fotometrabil cu ionul Cu^{+1}. (*Fig.3.1.*)

Proteinele se mai pot determina printr-o reacție de culoare dată cu colorantul trifenilmetanic *Coomassie® Brilliant Blue G–250 (Fig.3.2.).*

3.3. Purificarea proteinelor

Purificarea proteinelor se face în scopul determinării structurii acestora dar și pentru evitarea unor interferențe pe care compușii cu care se găsesc asociați inițial i-ar putea produce în utilizare.

Datorită complexității amestecului în care se găsește proteina, procesul de purificare prezintă dificultăți a căror mărime crește odată cu gradul de purificare cerut, și constă într-o serie de operații realizate într-o succesiune logică. Această succesiune depinde de localizarea proteinelor în materialul biologic. Proteinele se găsesc în microorganisme unde pot fi avea localizare intra- sau extracelulară, precum și în țesuturi sau organe animale ori celule vegetale. Procedurile de obținere a proteinelor sunt adaptate particularităților celulelor sursă (*Fig.3.3.*).

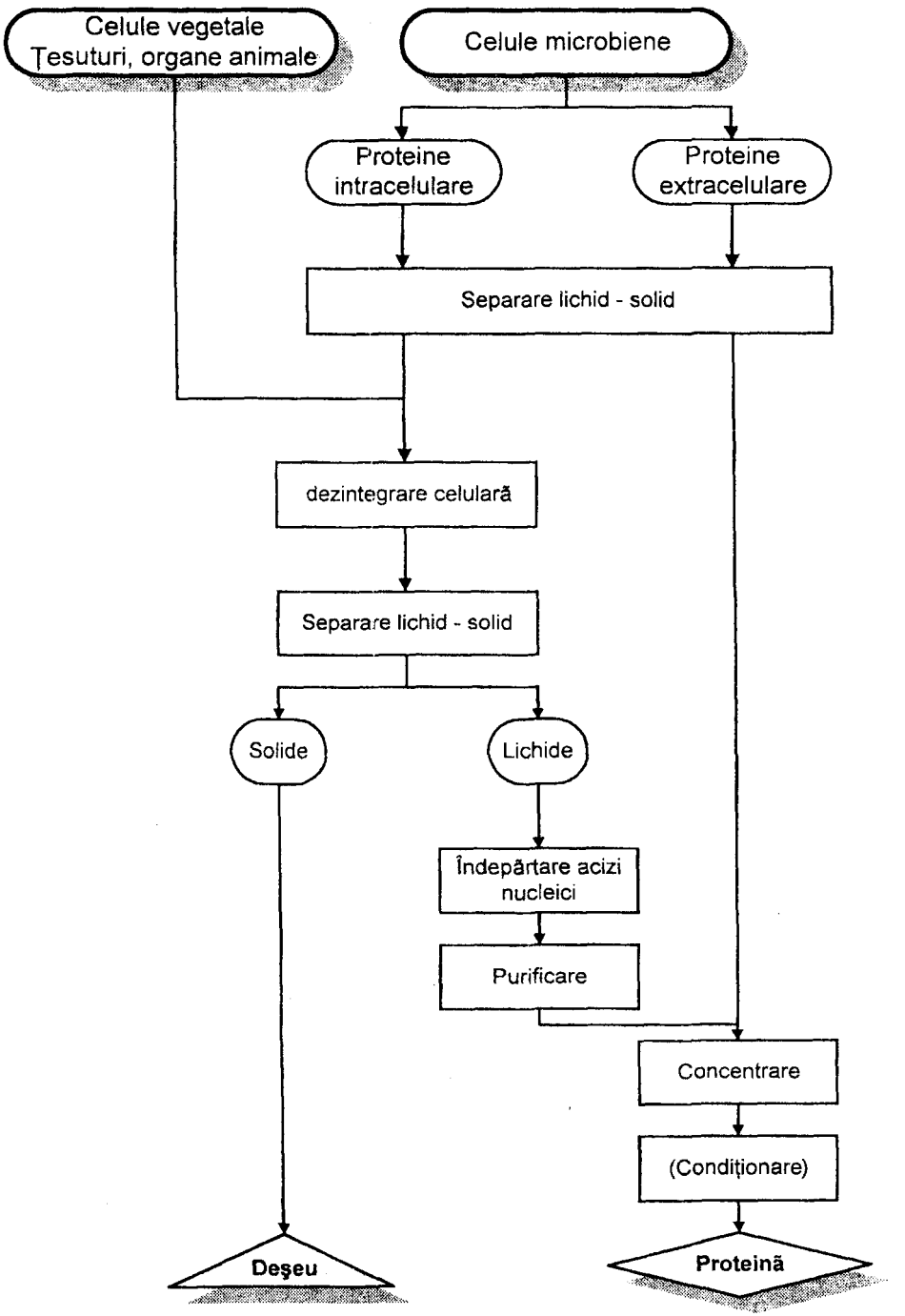


Fig. 3. 3. Schema de principiu de purificare a proteinelor

O restricție de care se ține seama, este legată de fragilitatea structurii edificiului proteic care poate suferi cu mare ușurință alterări.

3.3.1. Dezintegrarea celulară

Materialul biologic, care de cele mai multe ori constă dintr-un preparat celular sau tisular, în care proteina se găsește sechestrată în interior, trebuie supus inițial operației de dezintegrare celulară, prin care are loc ruperea (distrugerea) membranelor și a pereților celulari. Aceasta se poate realiza prin două categorii de metode: mecanice și nemecanice. Aplicabilitatea uneia sau alteia depinde de tipul de celulă utilizat, de sensibilitatea proteinei și de scara de aplicare (laborator, pilot până la cea industrială).

3.3.4.1. Metode mecanice de dezintegrare celulară

Sunt cele mai folosite, datorită simplității, costului redus și a lipsei de contaminare cu produse străine. Intensitatea procesului trebuie să asigure după caz, distrugerea peretelui celular, a membranei celulare sau a membranei structurilor subcelulare. Procedeele fizice utilizate trebuie să fie suficient de eficace, dar în același timp, să nu provoace denaturarea proteinei (modificarea structurii sale sub acțiunea forțelor care se dezvoltă). În practica uzuală se lucrează la rece, în prezența unor substanțe protectoare. Trebuie avut în vedere și faptul că distrugerea prea avansată a peretelui celular produce resturi de dimensiuni mici ale pereților sau membranelor, care pot contamina produsul, îngreunând procesele ulterioare de separare. De aceea uneori se preferă un randament de extracție mic printr-o omogenare incompletă dar cu avantajul simplificării operațiilor ulterioare respectiv al necontaminării. Rezultatul operațiilor de dezintegrare celulară mecanică este așa numitul omogenat celular.

3.3.1.1.1. Utilizarea de abrazivi

Agitarea energică, în prezența microbilelor de sticlă, de oțel, sau a nisipului fin, provoacă dezintegrarea celulelor prin ruperea pereților celulari, a membranelor și eliberarea constituenților citoplasmatici. Dezintegrarea este datorată atât frecării dintre particulele de abraziv și materialul celular cât și ciocnirilor care au loc. Gradul de dezintegrare depinde de viteza și durata agitării, de concentrația în celulă, de cantitatea și de mărimea microbilelor sau granulelor de nisip. Procesul se poate aplica de la scară de laborator (cu ajutorul mojarului cu pistil), la

scară pilot şi până la producţia industrială. Aparatele utilizate la scară mare sunt mori cu bile. Pentru mărirea intensităţii frecărilor, ele sunt prevăzute cu discuri plasate concentric sau excentric pe un ax central aflat sau nu în mişcare relativă faţă de corpul morii, sau pur şi simplu axul central mobil, are un diametru care se apropie de diametrul intern al aparatului.

3.3.1.1.2. Dezintegrarea prin destindere (liquid shear)

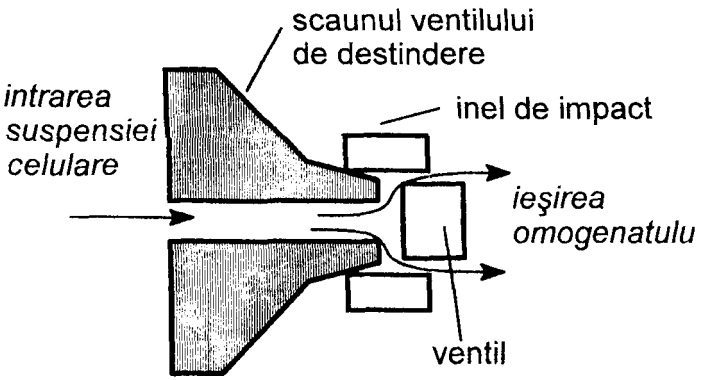


Fig. 3. 4. Schema de principiu a unui omogenizator MANTON-GAULAIN

Se realizează prin trecerea unei suspensii de celule, comprimată la presiune ridicată (de ordinul a 30–125 Mpa) printr-o valvă cu secţiune mică. Decomprimarea rapidă care are loc duce la „explozia" celulelor şi eliberarea conţinutului lor. Alte mecanisme prin care are loc distrugerea peretelui celular în acest tip de proces sunt frecarea foarte puternică de pereţii aparatului a componenţilor suspensiei celulare şi de asemenea impactul cu suprafeţele valvei (*Fig. 3.4.*) Deoarece comprimarea şi frecarea sunt însoţite de încălziri locale, este necesară prezenţa unui sistem de răcire eficace (circulaţie de alcool la –25 °C). Viteza cu care suspensia trece prin valva de destindere este de ordinul a 300–350 $m \cdot s^{-1}$. Omogenizatorul Manton - Gaulin care lucrează pe acest principiu poate realiza tratarea în sistem continuu a unui debit de 250 $l \cdot h^{-1}$. Această tehnică se aplică în special bacteriior Gram pozitive, al căror perete are o rezistenţă mecanică remarcabilă.

3.3.1.1.3. Dezintegrare ultrasonică

Este o operație aplicabilă în laborator. Ea constă în aplicarea unor vibrații de frecvență și energie ridicată asupra preparatului brut (suspensiei celulare). Sub influența vibrațiilor care se produc, au loc comprimări și decomprimări cu frecvență ridicată, în care variațiile locale de presiune ating valori considerabile. În faza de decomprimare are loc fenomenul de *cavitație*, care constă în vaporizarea instantanee a apei. Prin aceasta volumul ocupat crește, cu consecința distrugerii învelișurilor celulare. Tot prin cavitație se distrug pereții celulari în cazul dezintegrării prin destindere de la presiune ridicată.

3.3.1.2. Metodele nemecanice

În condiții particulare, eliberarea componenților celulari se poate face prin permeabilizarea peretelui celular. Aceasta se poate realiza prin tratament *chimic* sau tratament *enzimatic.*

Față de metodele mecanice tratamentul chimic prezintă avantajul că nu necesită o aparatură specializată iar resturile de pereți se pot elimina cu suficientă ușurință având în vedere că peretele celular este doar permeabilizat. Dezavantajul major este contaminarea produsului, ceea ce complică operațiile de purificare din aval, și în plus, dată fiind sensibilitatea proteinelor, posibilitatea denaturării acestora crește. Cu toate acestea, în cazuri particulare, metodele nemecanice pot oferi satisfacție.

3.3.1.2.1. Metodele chimice

Utilizează agenți precum:

Solvenții organici: toluenul, în concentrații de 0,5 – 8%, la eliberarea enzimelor din *Escherichia coli*, t-butanolul, metanolul, 2-propanolul, etanolul la eliberarea enzimelor din spațiul periplasmatic (la bacteriile Gram negative).

Detergenții: ionici, precum Tritonul–100, sau anionici precum dodecilsulfatul de sodiu, acționează asupra membranelor plasmatice sau ale formațiunilor infracelulare destabilizându-le.

Agenții chaotropici: precum clorohidratul de guanidină sau ureea. Deși pot produce cu ușurință denaturarea proteinelor, în cazul determinării condițiilor optime de lucru, utilizarea acestor substanțe devine eficientă pentru că pot fi îndepărtate cu ușurință prin ultrafiltrare, gelfitrare, sau dializă.

Tratamentul alcalin: este utilizat ca alternativă cu totul particulară de permeabilizare in cazul asparaginazei produse de *Erwinia carotovora*, respectiv al hormonului uman de creştere exprimat în E. coli.

3.3.1.2.2. Liza enzimatică

Digestia enzimatică a peretelui peptidoglicanic este realizată în cele mai multe cazuri de către lizozim (vezi cap. 4. secţiunea lizozim). Bacteriile Gram pozitive pot fi procesate mai simplu deoarece au stratul peptidoglicanic plasat în exterior. În cazul bacteriilor Gram negative, deoarece au stratul peptidoglicanic inclus între cele două membrane, acţiunea lizozimului trebuie completată cu acţiunea EDTA, care are rolul de a chelata cationii bivalenţi, permeabilizând membrana externă. Membranele plasmatice rămase fără consolidarea oferită de pereţi vor fi distruse sub acţiunea presiunii osmotice interne ridicate.

3.3.2. Separarea solid-lichid

În procesul de obţinere a proteinelor (vezi *Fig. 3.3.*) separarea lichid-solid apare fie în cazul proteinelor extracelulare bacteriene, când este necesară separarea fazei lichide (care conţine proteina) de biomasă, fie în urma operaţiei de dezintegrare celulară când este necesară îndepărtarea resturilor pereţilor şi membranelor celulare de faza lichidă care de regulă conţine proteina de interes. Principial se pot utiliza **filtrarea** şi **centrifugarea**. Filtrarea este utilizată în special la scară mare, industrială. Descrierea operaţiei este făcută pe larg în literatură. Specific pentru separările din biochimie şi biotehnologie este centrifugarea.

Omogenatul obţinut conţine, pe lângă o multitudine de proteine şi organite celulare, resturi de membrane celulare, precum şi alte substanţe neproteice. Îndepărtarea organitelor celulare şi a resturilor membranare se poate face prin *centrifugare diferenţială*. Parametrii procesului sunt forţa centrifugă şi durata. Forţa centrifugă depinde de diametrul rotorului şi de turaţie, se exprimă de obicei prin intermediul acceleraţiei centrifugale calculată ca multiplu al acceleraţiei gravitaţionale.[9] Pentru fiecare centrifugă există posibilitatea determinării acceleraţiei centrifuge, prin cunoaşterea turaţiei (n) şi a diametrului rotorului (d).

---

[9] acceleraţia centrifugă: $a_c = \omega^2 R$ unde ω reprezintă viteza unghiulară (rad · s–1). La rândul său $\omega = 2 \cdot \pi \cdot n$, unde n = rotaţii pe secundă

Printr-o operație de centrifugare diferențială se separă două faze: un precipitat (sediment) și o fază lichidă (supernatant). Cele două faze pot fi separate prin decantare. De exemplu, dacă proteina de interes se află în fracțiunea mitocondrială, omogenatul este centrifugat mai întâi 10 min. la 4000·g, pentru îndepărtarea resturilor de membrane și pereți celulari, a nucleelor și, în cazul celulelor vegetale a cloroplastelor. Supernatantul este apoi centrifugat la 15.000·g timp de 30 minute, izolându-se în precipitat mitocondriile. Dacă însă se dorește obținerea fracției ribozomale, atunci omogenatul inițial se centrifughează la 30.000 g timp de 30 minute, după care supernatantul se centrifughează la 100.000 g timp de 180 de minute, obținându-se fracția ribozomală dorită. În fine, dacă se urmăresc proteinele solubile, omogenatul se centrifughează timp de 180 min. la 100.000 g, reținându-se supernatantul. În tabelul de mai jos se prezintă câțiva dintre cei mai comuni parametri pentru separarea diferitelor fracții celulare din omogenatele obținute.

Tab. 3.1. Parametrii necesari separării diferitelor fracțiuni cu conținut proteic

Fracția sedimentată	Accelerația centrifugă (x g)	Timp (minute)
celule (eucariote)	$1 \cdot 10^3$	5
Cloroplaste, membrane celulare, nuclee	$4 \cdot 10^3$	10
Mitocondrii, celule bacteriene	$15 \cdot 10^3$	20
Lizozomi, membrane bacteriene	$30 \cdot 10^3$	30
Ribozomi	$100 \cdot 10^3$	180

3.3.3. Precipitarea diferențială

Separarea proteinelor din amestecul complex obținut după distrugerea pereților sau / și a membranelor se realizează pe baza proprietăților legate de *masa moleculară* (ultracentrifugarea, dializa, gel filtrarea), *proprietățile electrice* (electroforeza, separarea pe schimbători de ioni), *proprietățile hidrofob-hidrofile* (cromatografia de interacțiune hidrofobă, HPLC), precum și cele legate de *specificitatea legării* (cromatografia de afinitate).

Preparatul obținut prin centrifugare, sau uneori chiar omogenatul, se poate supune operației de precipitare diferențială sau fracționată. Această metodă reflectă stabilitatea extrem de redusă a structurii proteice, și este folosită curent în procesele de separare. Principial se pot utiliza două procedee: precipitarea la punctul izoelectric și precipitarea prin efect salin (salting in și salting out).

3.3.3.1. Precipitarea la punctul izoelectric

După cum se ştie, fiecare amfolit prezintă un pH specific la care numărul sarcinilor anionice devine egal cu numărul sarcinilor cationice. La acest punct mobilitatea electroforetică a substanţei devine nulă, iar solubilitatea devine minimă. Valoarea efectivă a punctului izoelectric depinde de balanţa grupărilor bazice (anioni), respectiv a celor acide (cationi). Cunoscându-se valoarea pH-ului izoelectric pentru o anume proteină, aceasta se poate precipita într-un tampon adecvat, separându-se prin centrifugare.[10]

3.3.3.2. Precipitarea prin efect salin.

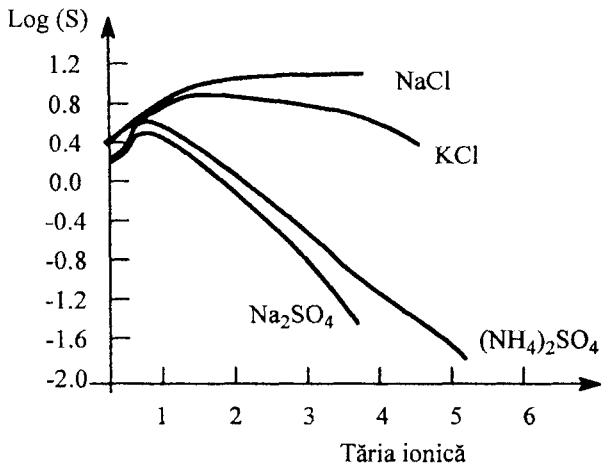


Fig. 3. 5. Variaţia solubilităţii cu tăria ionică pentru o proteină.

Procedeul mai este cunoscut şi sub numele de salefiere sau efect salting. În general proteinele prezintă o anumită solubilitate în apă, desigur cu excepţia scleroproteinelor. Datorită grupărilor ionogene, proteinele interacţionează în soluţie cu ionii. Interacţiunile sunt complexe. La concentraţii mici de ioni salini are loc o creştere a solubilităţii, datorată creşterii volumului sferelor de hidratare a proteinelor prin participarea ionilor străini. Fenomenul este cunoscut sub numele de efect salting in. La tării ionice care depăşesc praguri specifice proteinelor apare o descreştere a solubilităţii, ca urmare a formării sferelor de hi-

[10] În laboratorul de biochimie centrifugarea înlocuieşte aproape în totalitate filtrarea datorită pe de o parte consistenţei gelatinoase (necristaline) a precipitatului, dar şi cantităţilor mici cu care se lucrează.

dratare a ionilor pe seama apei care hidratează proteina, care poate evolua cu tăria ionică până la precipitare (*Fig.3.5.*). Acest fenomen este cunoscut sub numele de efect salting out, sau efect de relargaj.

Cauza acestui efect este de natură energetică: moleculele proteice tind să se asocieze, prin intermediul ionilor străini, care joacă rolul de liant, scăderea de entalpie la asociația proteină-ion-proteină compensând scăderea entropică datorată creșterii gradului de organizare. Comparativ cu variația de entalpie liberă la asociația proteină-ion-apă, primul tip de interacțiune are o valoare mai negativă, deci mai favorabilă, la concentrații ridicate de ioni salini, realizându-se astfel condițiile unei precipitări spontane a proteinei.

Cea mai comună substanță ionică utilizată este sulfatul de amoniu. Aceasta deoarece prezintă o solubilitate ridicată, iar efectul de relargaj apare la tării ionice (concentrații) mai scăzute decât în cazul altor ioni comuni.

Tehnica utilizată este relativ simplă. Cunoscându-se de exemplu că proteina precipită la o concentrație de 30% sulfat de amoniu, inițial se lucrează cu o concentrație ușor sub această limită, pentru precipitarea substanțelor care precipită în intervalul 0–30%. Acestea se îndepărtează apoi prin centrifugare. Supernatantului i se adaugă apoi sulfat de amoniu, până la atingerea concentrației de 30 %, când sub agitare, produsul dorit precipită, fiind separat printr-o nouă operație de centrifugare, fiind utilizat ca atare sau fiind pregătit pentru operații suplimentare de purificare. Substanța ionică utilizată la precipitare se îndepărtează cel mai adesea prin dializă, în saci de acetat de celuloză, cu dimensiunea controlată a porilor. Substanțele cu dimensiune mică pot trece în mediul extern, care de regulă conține apă distilată, în timp ce substanța proteică, de dimensiune moleculară mare, nu poate trece.

3.3.4. Metode cromatografice pe coloană

Sunt folosite pe scară largă datorită eficienței, dar și posibilității de a se lucra cu cantități relativ mari de substanță, fiind utilizate în scop preparativ. În funcție de umplutura folosită distingem mai multe tipuri de procedee:

3.3.4.1. Cromatografia de excluziune sterică sau gel filtrarea

Este o metodă care folosește ca proprietate de separare dimensiunea moleculară. Faza staționară este formată dintr-o substanță reticulată, cu dimensiunea ochiurilor controlată, hidrofilă. Aceasta se introduce în

coloană sub formă de gel, într-un solvent organic apos[11]. Amestecul supus separării este format din molecule de mărimi diferite. Acest amestec se aplică pe suprafața gelului. Antrenarea moleculelor prin gel se va face cu ajutorul aceluiași solvent. Moleculele cu dimensiune mare vor trece printre straturile moleculare ale fazei staționare, fiind puțin frânate în deplasarea lor. Moleculele cu dimensiune mai mică vor putea difuza în interiorul porilor rețelei reticulate a fazei staționare, fiind cu atât mai puternic reținute cu cât dimensiunea moleculară este mai redusă. Ca faze staționare se pot utiliza polimeri reticulați precum dextrani de tip Sephadex. (vezi la capitolul Glucide), sau agaroză de tip Bio-Gel A, ori acrilamidă Bio-Gel P. Faza staționară reține moleculele de dimensiune mică. În funcție de gradul de reticulare se poate lucra cu diferite domenii ale dimensiunilor moleculare. Metoda are avantajul unei mari simplități, a unei agresivități extrem de reduse față de componentele amestecului supus separării. O calitate deosebită a gel filtrării este aceea a unei transpuneri relativ facile la condiții industriale. Dintre dezavantajele metodei menționăm pierderea mare de presiune datorită rezistenței hidraulice a stratului de gel și precizia redusă a separării. Din acest motiv, gel filtrarea este utilizată ca o metodă de separare a amestecului în fracțiuni mai înguste și nu o separe pe componente.

3.3.4.2. Cromatografia de schimb ionic.

Se bazează pe sarcina netă la un anumit pH a diferitelor substanțe. Ca fază staționară se utilizează cel mai adesea celuloză derivatizată cu diferite grupări ionogene:

- $(PO_3)^{2-}$,(fosfoceluloză),
- CH_2-CO_2^-,(carboximetilceluloză),
- $(CH_2)_2$-$NH^+(CH_2$-$CH_3)_2$ (dietilaminoetilceluloză sau DEAE-celuloză).

3.3.4.3. Cromatografia de interacțiune hidrofobă.

Folosește ca fază staționară tot o celuloză derivatizată cu catene hidrocarbonate de dimensiuni relativ mari (de exemplu C8, C18 etc.). Reținerea se face în funcție de hidrofobicitatea proteinei.

[11] Sunt dezvoltate și sisteme de gel filtrare care nu utilizează apa

3.3.4.4. Cromatografia de afinitate

Spre deosebire de celelalte metode convenționale de separare, care se bazează pe valorile diferite ale unei anume proprietăți fizice, cromatografia de afinitate ca metodă de separare, calitativă dar și cantitativă, se bazează pe specificitatea legării dintre componentul de separat (în cazul particular substanțe proteică) și o anume substanță. Legarea celor doi compuși se face prin interacțiuni necovalente, extrem de specifice, implicând zone din cele două suprafețe moleculare. Substanța care prezintă afinitate față de proteină se găsește de regulă imobilizată pe un suport inert. Cupluri de substanță care pot interacționa sunt lectină: glicolipidă, sau glicoproteină sau glucidă, enzimă: coenzimă, anticorp - antigen etc. Separările prin cromatografia de afinitate sunt extrem de specifice, fiind de cele mai multe ori utilizate în fazele finale ale purificărilor.

3.3.4.5. Cromatografia de înaltă performanță sau presiune (HPLC).

Este o variantă a cromatografiei de interacțiune hidrofobă, la care se utilizează faze staționare hidrofobe dar care lucrează la presiuni ridicate. Aceasta conferă procesului o foarte bună rezoluție.

3.3.5. Electroforeza

Este o metodă extrem de eficace de separare a amestecurilor de proteine. Trebuie subliniat că electroforeza este mai mult o metodă de verificare a purității unui preparat proteic, decât o metodă efectivă de separare. Se bazează pe mobilitatea electroforetică a componenților supuși separării, care depinde de masa moleculară respectiv de sarcina electrică. Pentru reducerea numărului de variabile în procesul de separare amestecul proteic se supune în prealabil acțiunii unui detergent anionic: dodecilsulfatului de sodiu (SDS). Moleculele de detergent vor înconjura moleculele proteice, în număr cu atât mai mare cu cât masa moleculară a substanței proteice este mai ridicată. Se obțin astfel agregate anionice a căror sarcină, este corelată cu suprafața moleculară (implicit volumul respectiv masa moleculară). În câmpul electric după o anumită perioadă de timp aceste agregate se vor distribui dup sarcina lor.

Separarea proteinelor se face aproape întotdeauna pe geluri (uneori se poate realiza și pe suporturi solide precum hârtia).

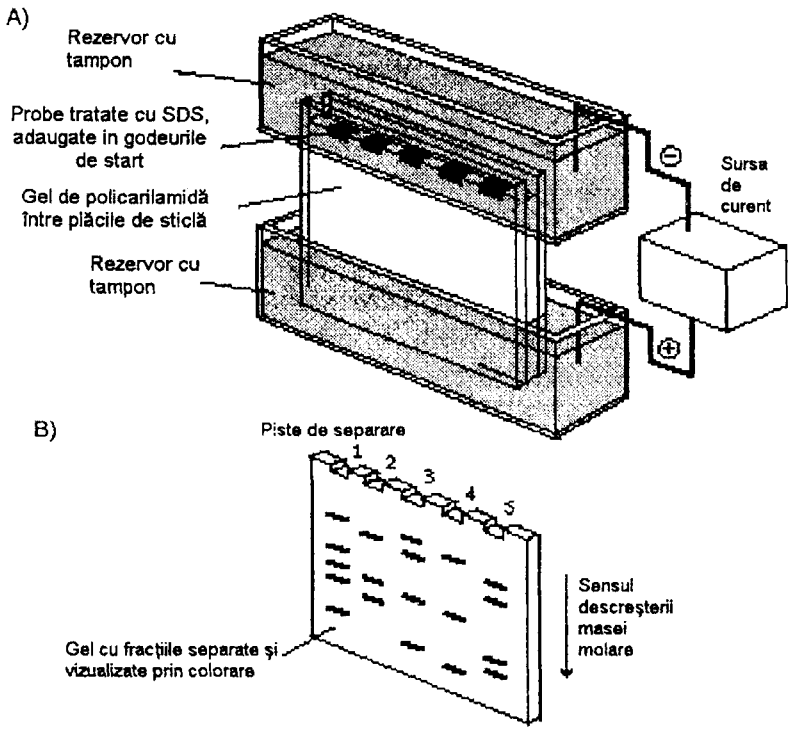


Fig. 3.6. Separarea proteinelor prin electroforeza verticală

Utilizarea gelurilor reticulate prezintă avantajul eliminării curenţilor convectivi[12], care în mediu lichid ar deranja separarea. In plus, prin reticulare apare o reţea de clasare, care amplifică eficacitatea separării. Ce mai adesea se utilizează ca gel un pat de poliacrilamidă reticulată, prin copolimerizarea acrilamidei cu N,N'-metilenbisacrilamidă. Revelarea se face cu ajutorul unor coloranţi specifici (Coomassie Briliant blue). Datorită utilizării SDS şi a gelului de poliacrilamidă, metoda poartă numele de **SDS-PAGE**. Această metodă este folosită în special pentru separarea pe bază de masă moleculară a proteinelor. Trebuie subliniat că, datorită utilizării detergentului, proteina suferă alterări ale structurii implicit a funcţiilor sale biologice. Pentru estimarea purităţii unei proteine se recurge la electroforeza fără detergent (electroforeza PAGE). În acest caz nu are loc denaturarea proteinelor, proteina de interes poate fi identificată deci prin reacţii specifice biologice, iar proteinele care o însoţesc pot fi cuantificate după revelare corespunzătoare.

[12] aceşti curenţi apar ca urmare a apariţiei gradienţilor termici datorită trecerii curentului prin electrolit

O variantă a electroforezei este **focalizarea izoelectrică**. Această metodă se bazează pe utilizarea unui amestec de amfoliți, care sunt inițial lăsați să se distribuie pe lungimea tubului electroforetic sub influența câmpului electric, desigur în funcție de sarcina fiecărei particule de amfolit. Această operație creează în coloana electroforetică un gradient de pH. După realizarea acestuia, se introduce amestecul de proteine care va migra. Fiecare component se va opri la poziția corespunzătoare propriului punct izoelectric. Metoda este extrem de sensibilă, permițând separarea proteinelor care diferă între ele prin sutimi de unități ale valorilor pH-ului izoelectric.

O altă metodă care combină avantajele celor două variante mai sus prezentată este **electroforeza bidimensională**. Aceasta constă în realizarea unei focalizări electroforetice pe o fâșie îngustă de gel. Fâșia care conține gelul cu proteinele separate prin izofocalizare se plasează la o extremitate a unei plăci pătrate cu gel cu SDS, după care are loc o nouă separare electroforetică, pe direcție perpendiculară.

3.4. Compoziția proteinelor

3.4.1. Conținutul de aminoacizi din proteine

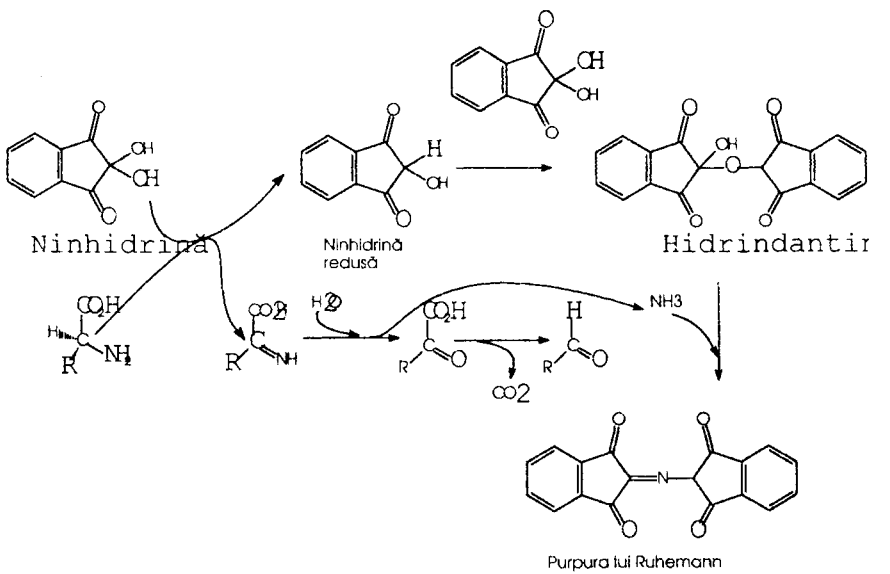


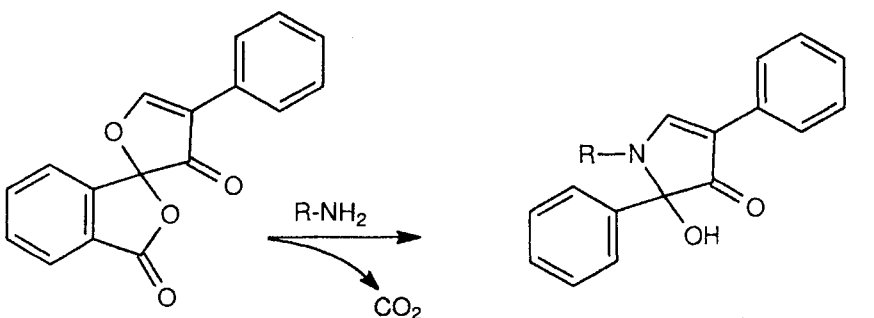
Fig. 3.7. Mecanismul reacției aminoacizilor cu ninhidrina

Legătura peptidică este extrem de rezistentă la hidroliză. Deși este mai eficientă, hidroliza alcalină poate conduce la degradări mult mai importante ale aminoacizilor decât hidroliza acidă. De aceea, ca metodă de elecție se folosește hidroliza acidă, realizată în condiții „dure": HCl 6N reflux 12–96 de ore. În aceste condiții se distruge triptofanul care trebuie evaluat indirect (printr-o hidroliză alcalină cu NaOH 2–4M, 8 ore la 100°C). De asemenea trebuie avute în vedere hidroliza asparaginei și a glutaminei, precum și degradarea hidroxiaminoacizilor alifatici (serina și treonina). Există corecții care se aplică în funcție de durata hidrolizei și de concentrația acidului.

Masa de aminoacizi rezultată se supune separării în vederea dozării. Separarea se poate face pe coloane cu schimbători de ioni (cationiți), folosind pentru eluare volume de tampoane diferite, în acord cu creșterea pH-ului acestora (tampon citrat 0,2M pH 3,25; tampon citrat 0,35M pH 5.25). Ordinea de separare a aminoacizilor este:

Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, Hys, Arg. Fiecăruia dintre acești aminoacizi îi corespunde, pentru o coloană dată, un volum dat de tampon. Evaluarea cantitativă se face după fotometrarea produsului de transformare al ninhidrinei – *Fig.3.7.* – (până la 10 nmoli), respectiv al florescaminei (4-fenil spiro-[furan–2(3H),1-ftalan]–3,3'dionă) sau numele sinonim *Fluram* (*Fig.3.8.*). Limita de detecție a acestui reactiv ajunge până la 10 pmoli.

Din amestecul rezultat la hidroliză se poate face o evaluare a conținutului de aminoacizi și prin cromatografie pe strat subțire, urmată de o fotodensitometrare a cromatoplăcii, după revelarea corespunzătoare cu ninhidrină sau cu florescamină.



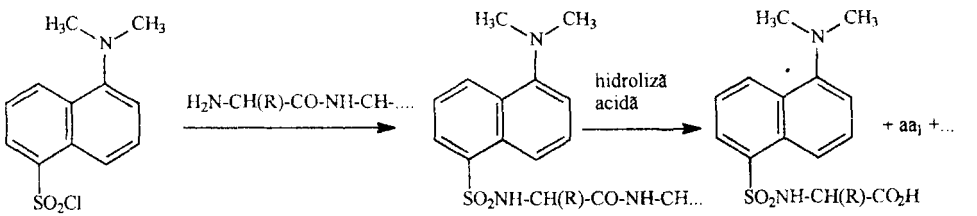
Florescamina ***Derivat puternic fluorescent al fluorescaminei cu aminoacizii***

Fig. 3.8. Florescamina indicator alternativ la revelarea aminoacizilor

O altă posibilitate este utilizarea HPLC, după derivatizarea cu feniltioizocianat. Solventul de eluare este acetonitrilul. De asemenea se poate utiliza cromatografia gazoasă. Și în acest caz este necesară o prealabilă derivatizare, în scopul măririi volatilității, prin formarea de esteri metilici, realizabilă prin reacție directă cu metanolul în condiții acide, sau prin utilizarea diazometanului.

3.4.2. Identificarea aminoacizilor N-terminali

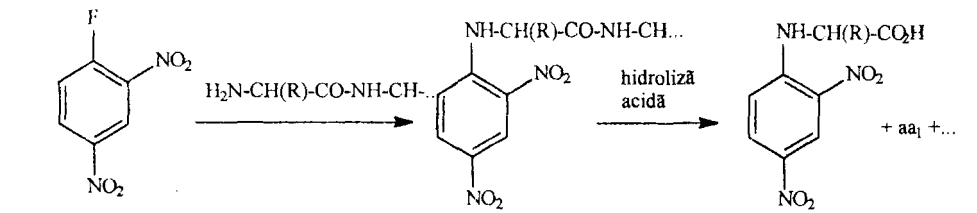
Se realizează prin dansilare. Aceasta constă în tratarea proteinei cu clorură de dansil (N,N dimetilaminonaftil–5-sulfoclorură). Rezultă o sulfonamidă rezistentă la hidroliză. În urma hidrolizei acide sulfonamida aminoacidului N-terminal se separă și se identifică (*Fig.3.9*).



Clorură de dansil

Fig. 3.9. Dansilarea, metodă de identificare sau marcare a aminoacidului N-terminal

O metodă asemănătoare este cea propusă și utilizată de SANGER în anul 1953, care folosește 2,4-dinitrofluorobenzenul. Această substanță va fi un substrat pentru o reacție de substituție nucleofilă aromatică realizată de gruparea aminoterminală a polipeptidei. În urma hidrolizei se poate identifica astfel aminoacidul N-terminal similar cu metoda dansilării.



2,4 dinitrofluorobenzen

Fig. 3. 10. Metoda SANGER de identificare a aminoacidului N-terminal

3.4.3. Identificarea aminoacizilor C-terminali

Se poate realiza chimic sau enzimatic. O variantă *chimică* frecvent utilizată este **hidrazinoliza**, cunoscută ca metoda AKABORI (*Fig.3.11*). Aceasta constă în tratarea polipeptidei cu hidrazină la 100°C. Hidrazina scindează toate legăturile peptidice, formând aminoacilhidrazidele corespunzătoare, cu excepția aminoacidului C-terminal care rămâne nesubstituit:

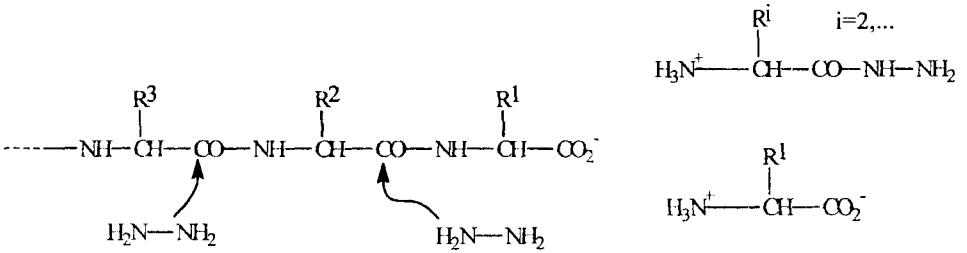


Fig. 3. 11. Metoda AKABORI de identificare a aminoacidului C-terminal

Aminoacidul nesubstituit poate fi identificat prin reacții specifice.

O altă variantă chimică se bazează pe **reducerea grupării carboxil libere** cu hidrură de litiu și aluminiu $LiAlH_4$. În urma hidrolizei acide, rezultă un amestec de aminoacizi împreună cu aminoalcoolul corespunzător aminoacidului C-terminal, care se determină de asemenea specific.

Metodele *enzimatice* utilizează carboxipeptidazele de tip A, B, C și Y.

Carboxipeptidaza A, extrasă din pancreasul bovin, clivează toate tipurile de legături peptidice C-terminale cu excepția celor care au ca aminoacid C-terminal arginina, lisina și prolina. **Carboxipeptidaza B**, extrasă din pancreasul porcin, clivează doar legăturile peptidice C-terminale care eliberează arginina și lisina. Utilizarea amestecului de carboxipeptidază A și B va putea deci elibera orice aminoacid terminal cu excepția prolinei. **Carboxipeptidaza C** (din frunzele de lămâi) și **Carboxipeptidaza Y** (din drojdia de bere) pot cliva orice legătură peptidică C-terminală. Diferențieri apar sub raportul disponibilității acestor enzime, dar și al cineticii de hidroliză, particulară pentru fiecare tip de legătură hidrolizată.

3.5. Structura proteinelor

Componenta care determină activitatea şi implicit funcţiile acestei mari clase de substanţe este structura. Complexitatea edificiului molecular, a cărui stabilitate este asigurată de interacţiuni fizice şi chimice care acoperă întreaga paletă a tăriei, de la legături covalente până la forţe Van der Waals de dispersie, este ridicată şi diversă. De aceea, studiul unor asemenea structuri nu se poate face fără o sistematizare bazată pe criterii riguroase. La proteine, structura se poate detalia pe patru nivele, cu complexitate şi implicit conţinut de informaţie direct corelate. În ultimii ani începe să se contureze o abordare mai detaliată a structurii proteinelor introducându-se termeni ierarhici noi. Cei mai folosiţi sunt cei de structură suprasecundară, respectiv de domenii, care apar între structura secundară şi cea terţiară.

3.5.1. Structura primară a proteinelor

Este dată de secvenţa de aminoacizi a catenei polipeptidice. Legarea aminoacizilor se realizează aşa după cum se cunoaşte prin legături peptidice (amidice), care se stabilesc între grupările carboxil şi amino ale aminoacizilor, ambele în poziţie relativă α. Acest tip de legătură conferă catenei particularitatea alternanţei unor porţiuni rigide (legăturile amidice -OC-NH-) cu porţiuni mobile (-HN-C_α-CO-). Aceasta datorită tautomeriei grupării amidice (*Fig.3.12.*). Încă din 1930, Linus PAULING şi Robert COREY, pe baza studiilor de difracţie a razelor X, realizate pe catene polipeptidice au evidenţiat că lungimea legăturii amidice este de 1,32 Å faţă de 1,49 Å, caracteristică legăturii simple C-N, respectiv 1,27 Å, pentru legătura dublă C=N.

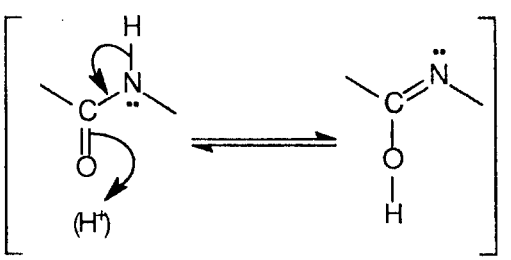


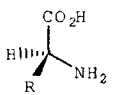
Fig. 3. 12. Tautomeria legăturii peptidice

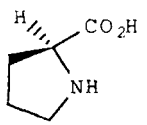
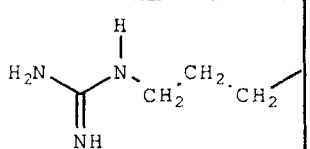
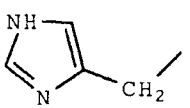
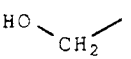
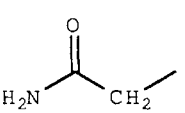
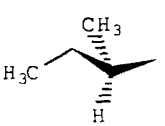
În structura catenei polipeptidice intră setul celor 20 de aminoacizi naturali, toţi din seria L (*Tab.3.2*). Din aceşti aminoacizi pentru om, nouă sunt esenţiali (vezi mai departe). Caracteristica de esenţialitate, atribuită unei substanţe se referă la imposibilitatea organismului de referinţă de a o sintetiza, prezenţa sa în respectivul organism fiind rezultatul exclusiv al aportului exogen. Acest aport poate fi ori direct, atunci când substanţa propriuzisă provine din exterior, ori indirect, atunci

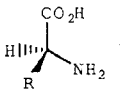
când din exteriorul organismului provine un precursor, care poate fi modificat chimic în organismul gazdă.

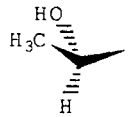
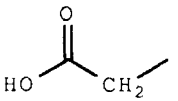
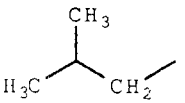
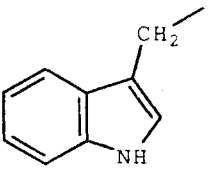
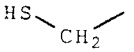
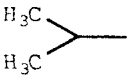
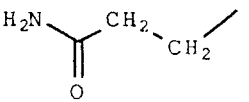
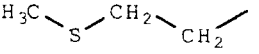
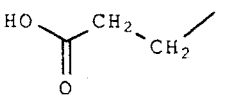
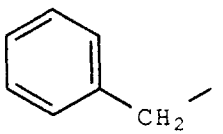
Se utilizează două sisteme de prescurtări ale aminoacizilor, listate în tabelul de mai jos: o abreviere din trei litere și un simbol dintr-o literă. Rotația planului luminii polarizate depinde de natura aminoacidului. Proprietăți importante sunt valorile punctului izoelectric (pHi), utilizabile în precipitarea fracționată în gradient de pH, sau la electroforeza de izofocalizare, precum și valorile pKa corespunzătoare funcțiilor α-carboxil și α-amino protonate:

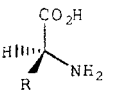
Tab.3.2. Aminoacizii naturali cu denumire, prescurtări, valorile pKa și pHi

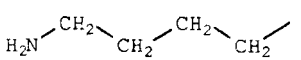
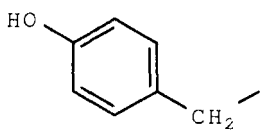


R	Denumirea uzuală și prescurtări	pKa (α-CO_2H)	pKa (α-NH_3^+)	pHi
H_3C-	L-(+)-alanină, Ala, A	2,35	9,66	6,02
H-	Glicină, Gly, G	2,34	9,60	5,97
	L-(-)-prolină, Pro, P	1.99	10,60	6,30
	L-(+)-arginină, Arg, R	2,17	9,04 (α-NH_3^+)	10,76
	L-(-)-histidină, His, H	1,82	9,17	7,59
	L-(-)-serină, Ser, S	2,21	9,15	5,68
	L-(-)-asparagină, Asn, N	2,02	8,80	5,41
	L-(+)-izoleucină, Ile, I	2,36	9,68	6,02



R	Denumirea uzuală şi prescurtări	pKa (α-CO_2H)	pKa (α-NH_3^+)	pHi
	L-(-)-treonină, Thr, T	2,09	9,10	5,60
	Acidul L-(-)-aspartic (L-asparagic), Asp, D	2.09	9,82	2,98
	L-(-)-leucină, Leu, L	2,36	9,60	5,98
	L-(-)-triptofan, Trp, W	2,38	9,39	5,88
	L-(-)-cisteină, Cys, C	1,71	9,90 8,27(SH)	5,02
	L-(+)-valină, Val, V	2,32	9,62	5,97
	L-(+)-glutamină, Gln, Q	2,17	9,13	5,70
	L-(-)-metionină, Met, M	2,28	9,21	5,06
	acid L-(+)-glutamic, Glu, E	2,19	9,67	3,22
	L-(-)-fenilalanină, Phe, F	1,83	9,13	5,48



R	Denumirea uzuală şi prescurtări	pKa (α-CO_2H)	pKa (α-NH_3^+)	pHi
	L-(+)-lisină, Lys, K	2,18	8,95	9,74
	L-(-)-tirosină, Tyr, Y	2,20	9,11	5,67

* *prolina este singurul aminoacid natural care nu se încadrează în formula generală.*

Omul are nevoie de nouă aminoacizi esenţiali: F, H, I, K, L, M, T, W, V.

Numărul de posibilităţi de construire a unei catene peptidice care să conţină *a* aminoacizi de *b* tipuri este dat de relaţia a^b. De aceea cu cei douăzeci de aminoacizi se pot construi 20^{100} catene. Dacă masa medie a unei proteine de 100 de aminoacizi este de 13800[13] de daltoni, atunci masa tuturor celor 20^{100} de catene ar fi de $1{,}38 \cdot 10^{138}$ de daltoni, comparativ cu masa universului observabil, estimată la 10^{80} daltoni.

3.5.1.1. Determinarea structurii primare

Deoarece toate procedurile cunoscute şi utilizate până în prezent necesită fragmente scurte, de 15–20 aminoacizi, stabilirea secvenţei de aminoacizi este o operaţie laborioasă, care presupune parcurgerea mai multor etape:

a. Separarea catenelor proteinelor formate din mai multe lanţuri peptidice.

Această separare presupune desfacerea legăturilor care există în cazul homo- sau heteromultimerilor. De regulă asociaţiile heteromultimerice sunt necovalente de aceea interacţiunile care le stabilizează pot fi desfăcute prin utilizarea de soluţii 8M de uree sau 6M clorohidrat de guanidină ori alte soluţii saline concentrate.

[13] Masa molară medie a unui aminoacid este de 138 de daltoni

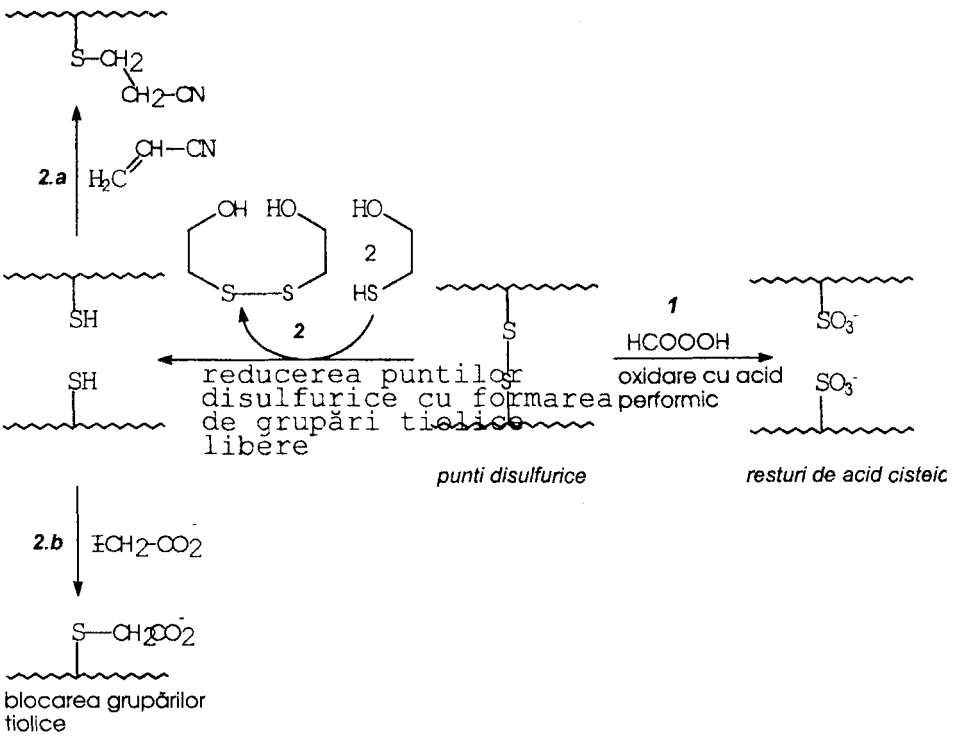


Fig. 3. 13. Desfacerea ireversibilă a punţilor disulfurice

b. Desfacerea punţilor disulfurice.

Dacă există punți disulfurice intercatenare, odată cu desfacerea acestora, realizată ca prim pas, se vor desface și punțile intracatenare. Desfacerea legăturilor covalente S-S se realizează practic prin două metode (*Fig. 3.13*):

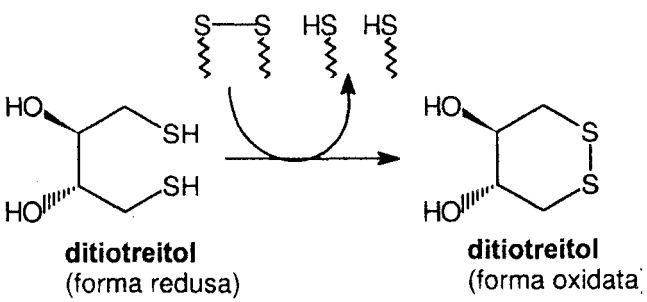


Fig. 3. 14. Ditiotreitolul, agent de desfacer a punţilor disulfurice

♦ prin oxidare cu acid performic (*Fig.3.13–1*), sulful din legăturile disulfurice se oxidează la sulfat (se formează resturi de acid cisteic).

♦ prin reducere cu mercaptoetanol ($HS-CH_2-CH_2-OH$), urmată de adiția acrilonitrilului la grupele tiolice (*Fig.3.13.2.a*) sau alchilarea resturilor -SH formate, prin intermediul iodoacetatului (*Fig.3.13.2.b.*). Reducerea punților disulfurice este urmată de blocarea grupărilor tiolice, deoarece aceste se pot reoxida cu ușurință refăcând punțile în pozițiile inițiale sau în alte poziții.

În locul mercaptoetanolului se poate folosi ditiotreitolul (*Fig. 3.14.*), o substanță cu două grupe tiolice care se pot oxida formând punți disulfurice intramoleculare.

c. Determinarea compoziției în aminoacizi pentru fiecare catenă polipeptidică

(rezultată la punctul 1, în urma separării). Se face după procedura hidrolizei acide totale urmată de cromatografiere (de regulă în analizorul de aminoacizi).

d. Identificarea aminoacizilor N- și C-terminali.

Se realizează după procedurile descrise anterior.

e. Fragmentarea fiecărei catene în lanțuri cu lungime mai redusă.

Pentru fragmentare se pot folosi enzime sau reactivi chimici.

Fragmentele obținute se separă și fiecărui fragment i se determină compoziția în aminoacizi și aminoacizii N- și C-terminali. Această procedură se repetă cu diferiți reactivi de clivare, fiecare cu altă regioselectivitate.

Enzimele utilizate sunt proteaze (*Fig.3.15*). Acestea dispun de selectivitate variabilă, Utilizarea combinată a lor permite în final obținerea univocă a secvenței catenei supusă analizei. *Tab.3.3.* listează cele mai folosite enzime, detaliind locul pentru care posedă afinitate.

Tab 3.3. Specificitatea de acțiune a hidrolizei peptidazice) cu referire la Fig.3.15.

Enzima	Situs preferat
Tripsina	R1: Lys, Arg
Clostripaina	R1: Arg
Chimotripsina	R1: Tyr, Phe, Leu, Ile, Val, Trp
Termolisina	R2: Tyr, Phe, Leu, Ile, Val, Trp
Pepsina	R1: Phe, Leu, mulți alți aminoacizi
Protează stafilococică (tampon fosfat)	R1: Asp, Glu
Protează stafilococică (tampon HCO_3^-)	R1: Glu
Subtilizina	R1: Mulți
Carboxipetidaza A	R2: Aminoacid C- terminal (exceptie, Arg, Tyr, Trp)

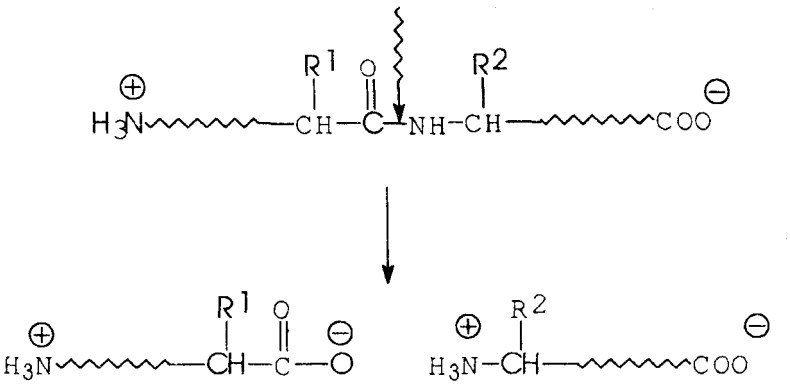


Fig. 3. 15. Clivarea enzimatică a legăturii peptidice

De notat că specificitatea atacului este corelată invers cu lungimea fragmentelor generate.

Dintre reactivii chimici, cel mai folosit este bromocianul (BrCN) în concordanță cu metoda pusă la punct de Bernard WITKOP și Erhard GROSS (*Fig.3.16*), Aceasta reacționează cu resturile de metionină. Se formează inițial un derivat de sulfoniu, care elimină metil sulfocianura, rezultând ca intermediar o iminolactonă. Prin acțiunea apei are loc hidroliza legăturii iminice.

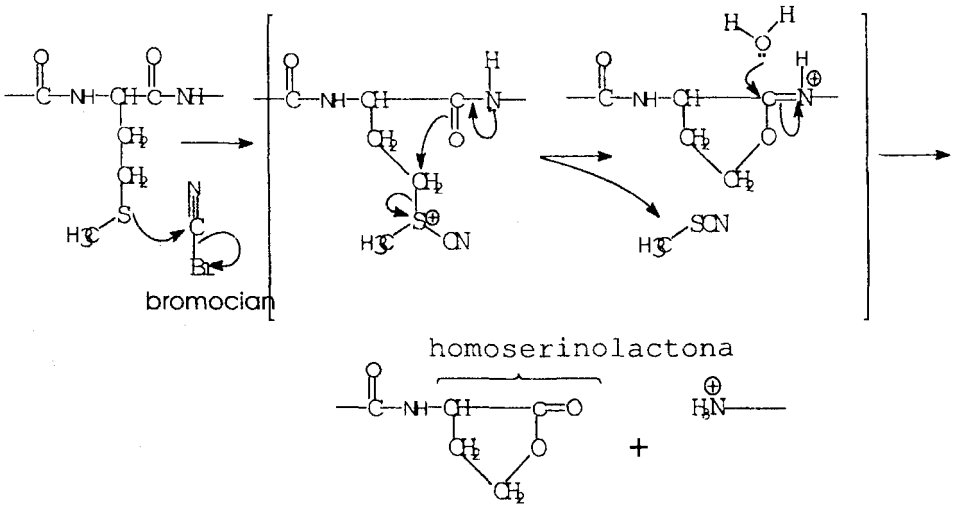


Fig. 3. 16. Clivarea cu bomocian a legăturii peptidice

f. Secvențarea fragmentelor

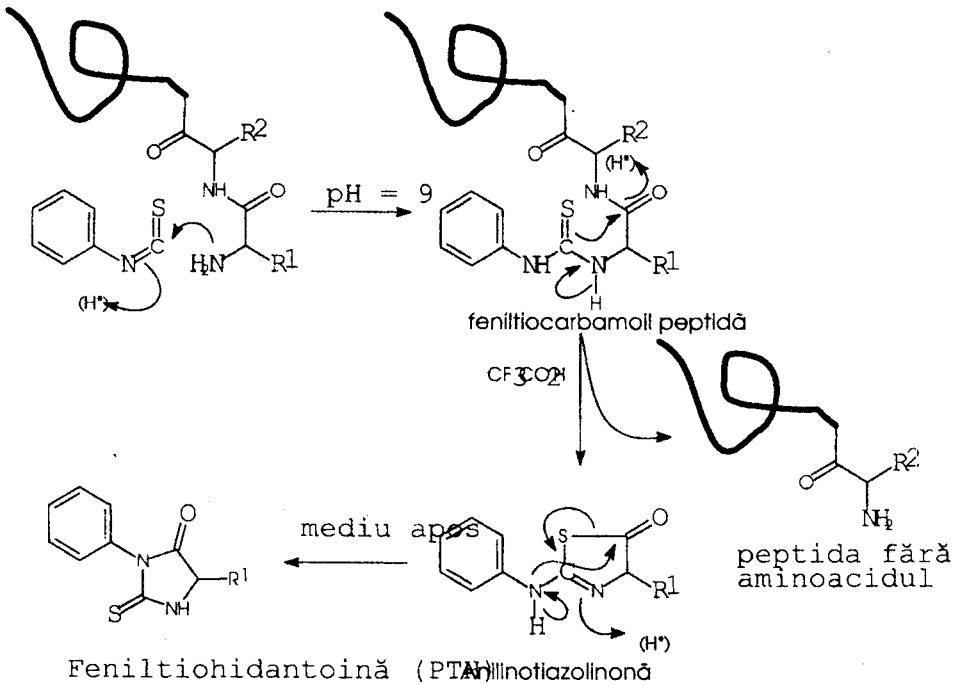


Fig. 3. 17. Mecanismul metodei EDMAN de secvențare a catenelor polipeptidice

Din catenele oligopeptidice, separate, cărora li se cunoaște compoziția în aminoacizi, aminoacizii N- și C-terminali se supun operației de secvențare, care deocamdată se realizează cel mai eficient cu ajutorul metodei lui EDMAN (*Fig. 3.17*). Aceasta constă în tratarea soluției care conține oligopeptida cu tioizocianat de fenil, care reacționează cu capătul N- terminal al catenei. Spre deosebire de metodele de derivatizare, expuse anterior, prin crearea mediului acid are loc decuplarea aminoacidului N-terminal cu formarea consecutivă a unui component ciclic, tiohidantoinic, care este identificat prin cromatografie de strat subțire sau prin HPLC. Metode se pretează la automatizare, fiind cunoscute în prezent o serie de secvențoare automate.

Pe lângă metoda EDMAN, asistăm la eforturi pentru folosirea spectrometriei de masă, clasice sau în varianta ei mai modernă (electrospray-mass spectrometry, care permite obținerea doar a picurilor moleculare). Utilizarea spectrometriei de masă pune problema creșterii volatilității probei, operație care poate fi făcută prin derivatizare, în principiu după tehnicile utilizate la gaz-cromatorgrafie.

Desigur, metoda este aplicabilă catenelor polipeptidice care au gruparea N-terminală liberă. În foarte multe cazuri aceasta este blocată, cel mai ades prin acetilare. Pentru secvențare EDMAN este necesară o prealabilă hidroliză.

g. Stabilirea secvenței catenei polipeptidice inițiale

se realizează prin operații de suprapunere a fragmentelor obținute și analizate.

h. Poziționarea punților disulfurice

se realizează prin electroforeza bidimensională a fragmentelor rezultate la fragmentarea prealabilă secvențării. Inițial se supune electroforezei amestecul rezultat la fragmentare, dar fără a fi supus în prealabil desfacerii punților disulfurice (prin oxidare sau reducere - alchilare). Fragmentele separate vor fi supuse acțiunii vaporilor de acid performic chiar pe placa de electroforeză, după care urmează separarea pe direcție perpendiculară celei inițiale. Fragmentele care nu conțin legături disulfurice vor migra pe aceeași distanță (în condițiile în care parametrii electrici sunt identici) fiind găsiți pe diagonala electroforeplăcii. În schimb, fragmentele cu punți disulfurice vor fi divizate apărând în spoturi separate, de regulă deasupra diagonalei, datorită mobilității electroforetice mai mari.

În decursul separărilor cromatografice pot apare aminoacizi neuzuali care dau reacția cu ninhidrina. Cauzele apariției acestor compuși sunt diferite:

1. Proteina a fost alterată în decursul extracției. Oxidarea grupelor tiolice (cisteina); modificări fotochimice (histidina, triptofanul) etc. În acest caz avem de face cu o viciere a rezultatelor analizei deci cu un artefact provocat de experimentator.

2. Proteina a fost modificată enzimatic de către celulă după sinteză (modificare post-translațională). Unele dintre aceste modificări nu rezistă la hidroliza acidă sau alcalină, cum se întâmplă în cazul legăturilor serină-fosfat, serină sau asparagină și glucide etc. Există modificări date de grupări noi, stabile la hidroliză cum ar fi hidroxilul sau carboxilul. Un exemplu este oferit de colageni, în care prolina existentă (20–25% din totalul aminoacizilor) poate suferi parțial transformarea în 4-hidroxiprolină; de asemenea se întâlnește și 5-hidroxilisină. 4-carboxiglutamatul rezultă prin carboxilarea postsintetică a glutamatului.

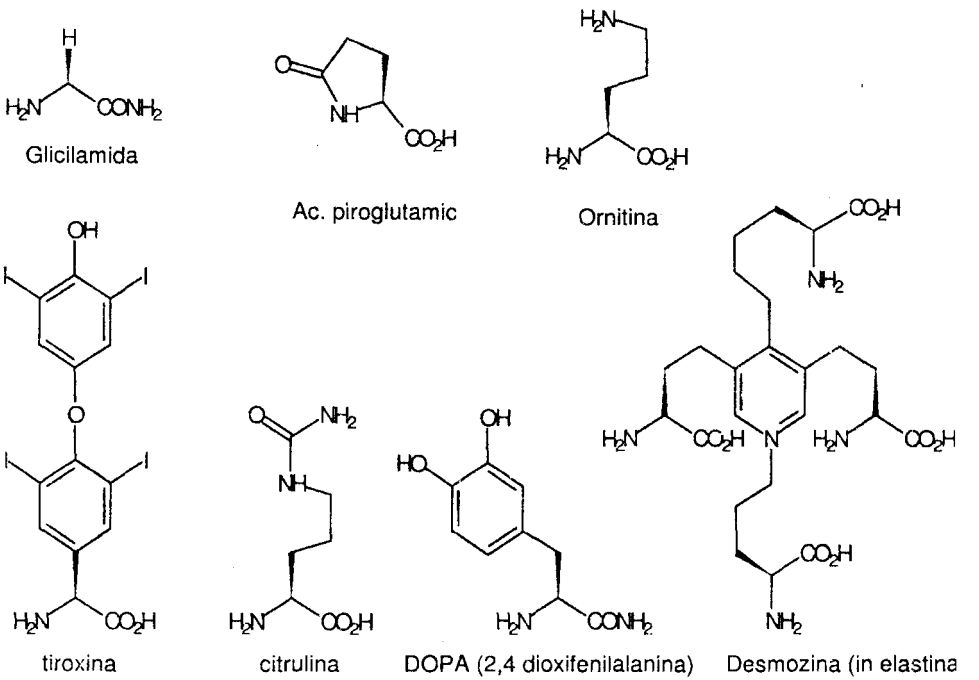


Fig. 3. 18. Aminoacizi atipici întâlniți în operațiile de identificare

3. Cei douăzeci de aminoacizi tipici sunt utilizați de sistemele celulare de biosinteză proteică pentru fabricarea catenelor polipeptidice. Pe lângă acești aminoacizi, precum și cei mai sus prezentați, se cunosc o serie de alți aminoacizi, cu răspândire mai redusă, care apar în celulă ca intermediari de biosinteză sau de degradare a diferitelor substanțe. ARN de transport precum și aminoacil-tARN sintetazele care, împreună fac parte din echipamentul de recunoaștere și incorporare a aminoacizilor, procesează doar aminoacizii tipici, de aceea, incorporarea altora este practic imposibilă. Câțiva dintre aminoacizii atipici întâlniți în celule sunt prezentați în *Fig.3.18.*

3.5.2. Structura secundară

Structurile de ordin superior celei primare, privesc conformația catenei (sau a catenelor polipeptidice). Aranjamentul spațial global al catenei polipeptidice depinde de totalitatea interacțiunilor intracatenare ce se stabilesc în macromolecula proteică. O observație a lui John KENDREW, primul care a analizat la rezoluție înaltă mioglobina, a stat la baza definirii structurii secundare. El a remarcat că resturile hidrofile ale aminoacizilor sunt dispuse către periferia structurilor proteice glo-

bulare, în timp de resturile hidrofobe sunt dispuse către interiorul agregatului molecular. Ori catenele laterale Ri corespunzătoare resturilor de aminoacizi sunt legate de catena principală, care constă în motivul repetitiv -[-NH-CH(Ri)-CO-]$_n$-. Acest motiv, deci întreaga catenă principală, prezintă o anume hidrofilicitate, conferită de capacitatea de a forma legături de hidrogen: a grupării -NH- (donoare) respectiv -CO- (acceptoare). De aceea, în lipsa apei, în interiorul hidrofob al macromoleculei, din raţiuni energetice, (minimizarea energiei libere), catena principală va tinde să-şi maximizeze numărul de legături de hidrogen realizate cu sine însăşi. Pentru aceasta, se vor mobiliza la maxim grupările donoare şi acceptoare din catenă, în interacţiuni reciproce (motivate de absenţa solventului protic sau a grupărilor hidrogenodonoare sau acceptoare).

În plus, rigiditatea legăturii amidice joacă un rol esenţial în determinarea conformaţiei globale, făcând ca mişcarea moleculei să fie posede de un număr mai redus de grade de libertate, fiecare legătură amidică, împreună cu cei patru atomi legaţi direct, determinând un plan nedeformabil.

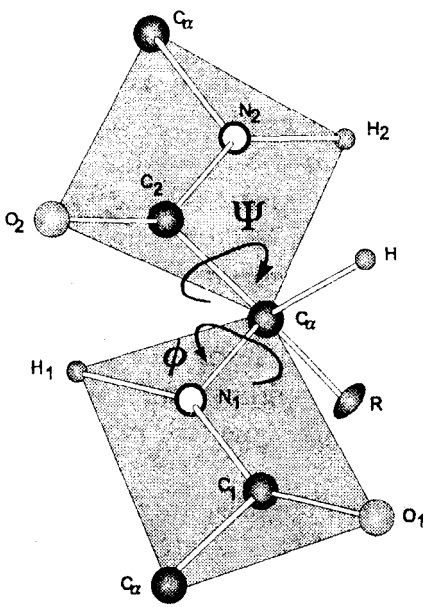


Fig. 3. 19.. Planurile legăturilor peptidice şi unghiurile diedre Ψ şi Φ

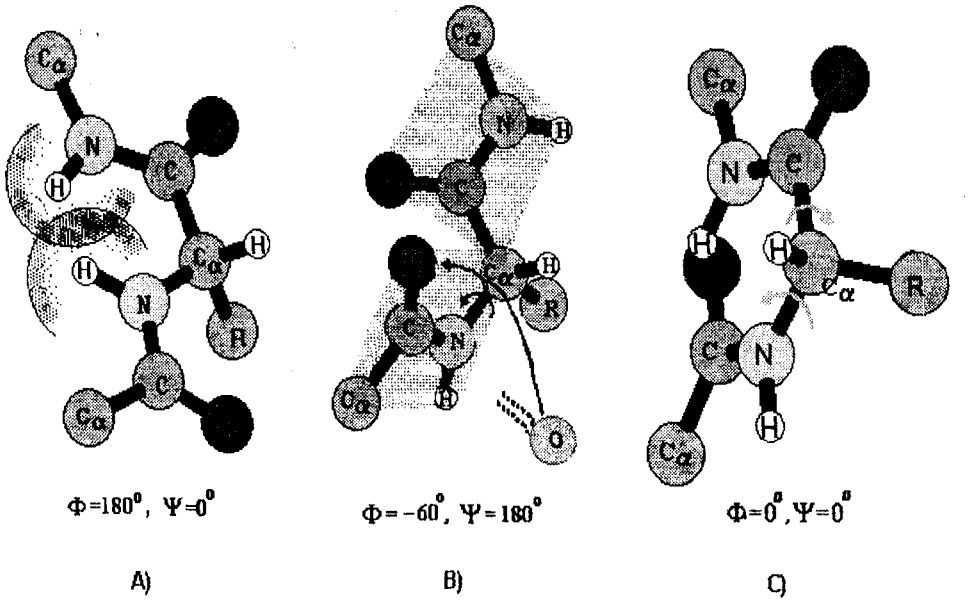


Fig. 3. 20. Posibilităţi de variaţie ale unghirilor Ψ şi Φ

Întreaga moleculă apare ca o succesiune de astfel de planuri, care pot avea o mişcare relativă doar prin rotaţiile legăturilor Cα - Ccarbonilic (Cα - C2), respectiv Cα - Namidic (Cα - N1). Cuantificarea poziţiei relative a planurilor adiacente se face prin intermediul unghiurilor diedre Φ şi Ψ. Acestea sunt pozitive dacă rotaţia se face în sens orar, atunci când sunt privite dinspre carbonul α. (*Fig.3.19.*).

Valoarea zero a unghiurilor Φ şi Ψ, este considerată aceea pentru care două planuri adiacente bisecţionează planul determinat de legăturile R - Cα - H, astfel încât cele două planuri să fie în configuraţia cis. (*Fig.3.20.* schema C). Deoarece atomii nelegaţi chimic se pot apropia până cel mult la distanţa corespunzătoare sumei razelor van der Waals, rezultă o serie de restricţii suplimentare în conformaţia globală a lanţului polipeptidic.

Dacă pentru un număr mare de proteine se reprezintă într-o diagramă pătrată numită diagrama Ramachandran perechile de unghiuri Ψ şi Φ, pentru fiecare aminoacid, se obţin zone de maximă densitate de puncte, denumite α, β şi L. (*Fig.3.21.*) Asupra acestora vom reveni.

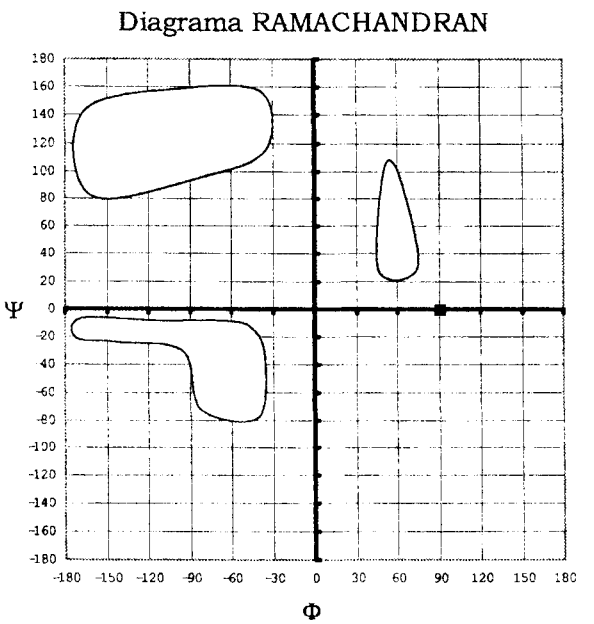


Fig. 3. 21. Diagrama RAMACHANDRAN

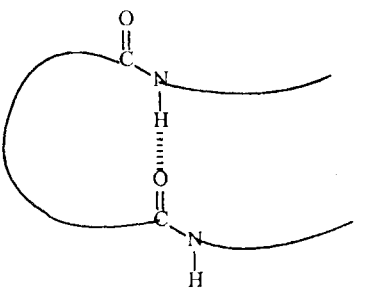


Fig. 3.22. Legături care stabilizează structuri secundare

Structura secundară este determinată doar de legăturile de hidrogen stabilite în catena principală, fără implicarea catenelor laterale (resturilor R ale aminoacizilor). Structura secundară se referă la un număr restrâns de forme canonice, identificate în formă pură pe porțiuni limitate în proteinele globulare. Aceste forme ale structurii secundare, practic detalii locale, sunt caracterizate de o succesiune de aminoacizi care posedă perechi de unghiuri Ψ, Φ care ocupă o suprafață limitată în planul Ramachandran. În funcție de valorile concrete ale perechilor Ψ,Φ sau altfel spus de zone în care se aglomerează punctele de coordonate Ψ_i, Φ_i se pot particulariza structurile secundare tipice, cunoscute

și sub numele de structuri secundare sau repetitive (prin aceea că perechile Ψ, Φ se repetă). Structurile secundare apar în zone hidrofobe, în care legăturile de hidrogen intracatenare la care participă doar componente ale legăturilor peptidice, depășesc în tărie pe cele dintre resturile de aminoacizi. De aceea structurile secundare apar ca elemente de organizare intermediară între secvența aminoacizilor în catenă, dată de structura primară definită univoc, și organizarea spațială globală a proteinei, care este dată de structura terțiară, la a cărei definire participă, așa după cu se va vedea, practic toate tipurile de interacțiuni; atât covalente cât și necovalente.

Față de structura primară, detaliul suplimentar adus de structura secundară este dat de *legăturile de hidrogen intracatenare realizate exclusiv între grupările NH și CO peptidice neadiacente* (*Fig. 3.22* și *Fig.3.23.*). Prezența acestor legături coroborată cu configurația R a tuturor aminoacizilor naturali din structura primară a peptidelor generează trei tipuri de modele canonice de structuri secundare catenei. Ele au fost teoretizate de către Pauling și Corey pe baza studiului de difracție de raze cu X a unui număr foarte ridicat de substanțe polipeptidice. Cuantificarea lor s-a făcut pe baza analizei unghiurilor Ψ,Φ în diagrama RAMACHANDRAN și corespund modelelor de maximă densitate din această diagramă (α, β și L)

3.5.2.1. Modele elicoidale de dreapta

Stabilizarea structurii secundare are loc prin realizarea unor legături de hidrogen, cu frecvență determinată, între grupările NH donoare și cele acceptoare CO de pe catenă. În funcție de numărul de resturi de aminoacizi per spiră (pas), respectiv numărul efectiv de atomi în ciclul închis de legătura de hidrogen, distingem mai multe modele helicoidale canonice (*Fig.3.24.*). De exemplu modelul α-helix se codifică cu 3,6(13), (legăturile de hidrogen care se stabilesc în catena principală din patru în patru resturi de aminoacizi delimitează un ciclu de 13 atomi). Se mai cunosc, este drept, cu o răspândire mai redusă, și alte tipuri de helixuri: 3,0 (10); 4,4(16) cunoscut ca model pi (π) și 2,7 (*Fig.3.28.*). Acesta din urmă este extrem de rar.

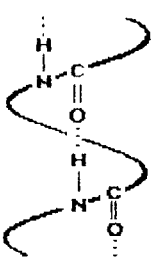


Fig. 3.23. Legături care stabilizează helixuri

Câteva detalii referitoare la modele helicoidale:

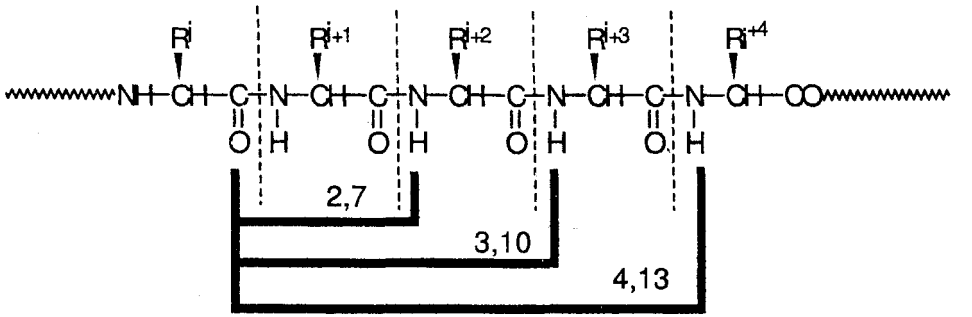


Fig. 3. 24. Modalităţile de formare a diferitelor tipuri de helixuri

3.5.2.1.1. Modelul α-helix (3.6,13)

Este modelul helicoidal cel mai răspândit la proteinele solubile. Catena principală are forma unui şurub de dreapta (tirbuşon). Parametrii modelului ideal sunt: pasul elicei: 5,4 Å, numărul de aminoacizi per spiră: 3,6. Catenele laterale ale aminoacizilor sunt dispuse în exteriorul helixului (*Fig.3.26.*). Legăturile de hidrogen se stabilesc din patru în patru legături peptidice, iar ciclul închis de o legătură de hidrogen include 13 atomi.

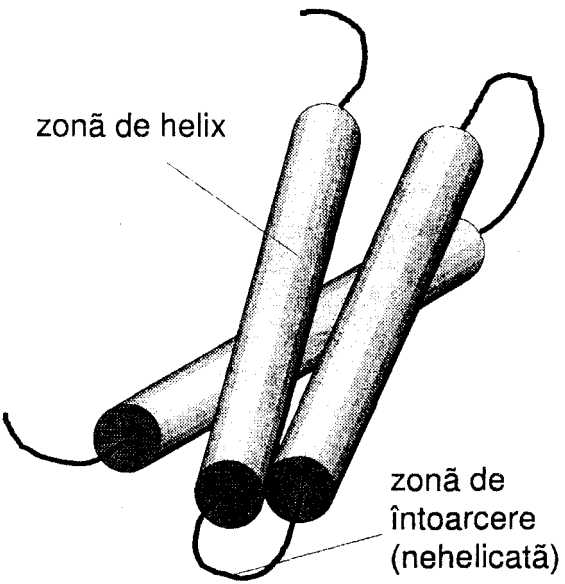


Fig. 3. 25. Dispunerea catenelor laterale la periferia helixului

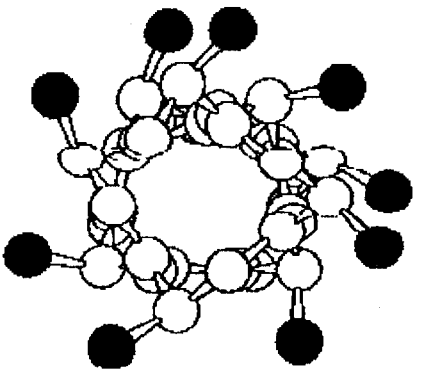


Fig. 3. 26. Alternanțe ale zonelor helicoidale cu zone nehelicate

Modelul α-helix este un model ideal, identificat pe porțiuni relativ reduse ca lungime în proteinele globulare. Aici, zonele helicate alternează cu cele lipsite de elicitate (*Fig.3.25.* – vezi structurile suprasecundare). Numărul de aminoacizi dintr-o zonă helicată este cuprins între 4-5 până la 40. Unghiurile Ψ și Φ sunt cuprinse între -60° și -50°. Valorile ideale determinate prin calcul sunt Ψ= -47.0° și Φ= -57.8° De aceea, în diagrama Ramachandran zona α corespunde structurii de helix. Proiecția unghiului care este făcut de dreptele care unesc un carbon alfa de cei doi atomi de carbon alfa adiacenți lui este de 100°. (*Fig.3.27.*).

Studii efectuate pe homopoliaminoacizi (catene polipeptidice formate din același tip de aminoacid) au arătat că tendința aminoacizilor de a forma spontan α-helixuri este diferită: astfel polileucina și polialanina de exemplu formează spontan α-helixuri, în timp ce acidul poliaspartic, respectiv poliglutamic, care la pH neutru sunt încărcați negativ, formează catene neregulate, datorită repulsiilor dintre grupările carboxilat. Prin coborârea pH-ului la valori de 1,5 - 2,5, prin protonare, interacțiunile diminuează în intensitate (rămânând doar legăturile de hidrogen), catenele respective putând adopta conformația alfa helicată. Această comportare o prezintă și polilisina care doar la pH = 12 devine α-helix.

Este de menționat prolina, respectiv derivații acesteia (3- și respectiv 5-hidroxiprolina care nu se acomodează cu structura de helix datorită existenței atomului de azot secundar. De aceea prolina este întâlnită în așa numitele puncte de întoarcere ale moleculei, de fapt zone dintre două porțiuni de helix. Pe lângă prolină, în aceste zone se mai găsește

frecvent glicocol, a cărui mobilitate ridicată este conferită de lipsa unei catene laterale. De altfel, într-o diagramă Ramachandran realizată numai pentru acest aminoacid, punctele se distribuie aproape uniform pe suprafață, atestând prezența glicocolului în toate tipurile de structuri, inclusiv în cele dezordonate (random coil).

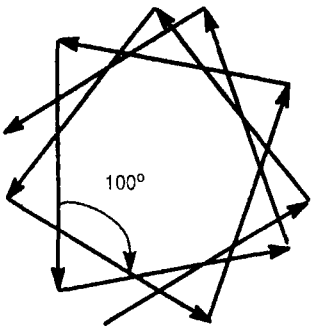


Fig. 3. 27. Proiecții ale direcțiilor legăturilor Cα-Cα

Un aspect care trebuie menționat este faptul că structura α-helix are un moment de dipol semnificativ, care polarizează pozitiv capătul N-terminal, respectiv negativ capătul C-terminal. Acest moment de dipol este rezultanta momentelor de dipol ale legăturilor amidice, orientate paralel cu axa helixului, prin topologia specifică a stabilirii legăturilor de hidrogen.

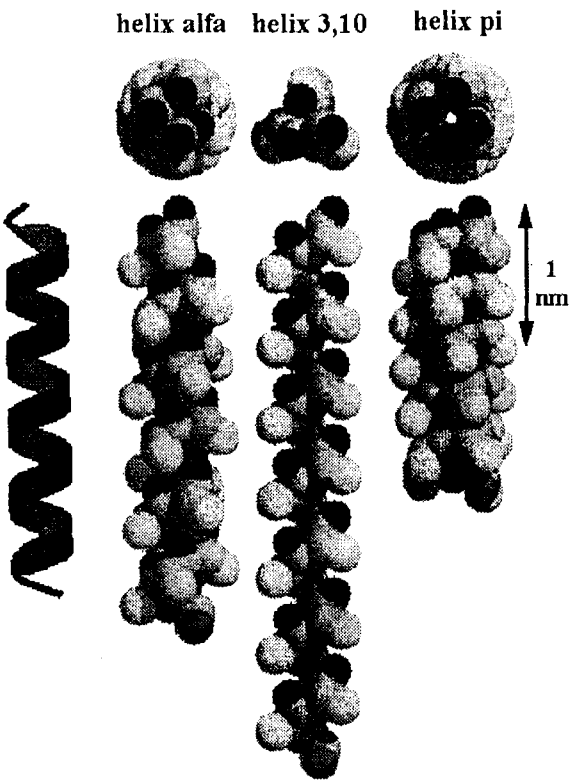


Fig. 3. 28. Modele helicoidale mai des întâlnite

3.5.2.1.2. Modelul 3,10

Este un model rar întâlnit în structurile proteice. Se identifică de regulă fie la capătul N-terminal, fie la capătul C-terminal al helixurilor de tip alfa. Valorile medii determinate experimental ale unghiurilor diedre ψ și Φ sunt respectiv –18,0° și –71,0°. Ele diferă de valorile calculate ale acestor unghiuri: –4,0° și –74,0°. Numărul de aminoacizi per spiră este de 3,2. Spre deosebire de dipolii legăturilor de hidrogen din catena principală a α-helixului, care sunt aliniați aproape perfect cu axa helixului, în cazul helixului 3,10 apare o deviație de cca. 30° a vectorului moment de dipol față de axa helixului.

3.5.2.2.3. Modelul helix-pi (4,4(16))

este un model extrem de rar. Legăturile de hidrogen se stabilesc din 5 în 5 resturi de aminoacizi. Ca și modelul 3,10, acest tip de model este întâlnit de regulă la capetele structurilor de tip α-helix. Parametrii modelului ideal sunt Φ = –57,1 și Ψ = –69,7°.

În *Fig.3.28.* se prezintă modelele cele mai frecvente ale helixurilor de dreapta.

3.5.2.2. Modelele β sau foi pliate (pleated sheets)

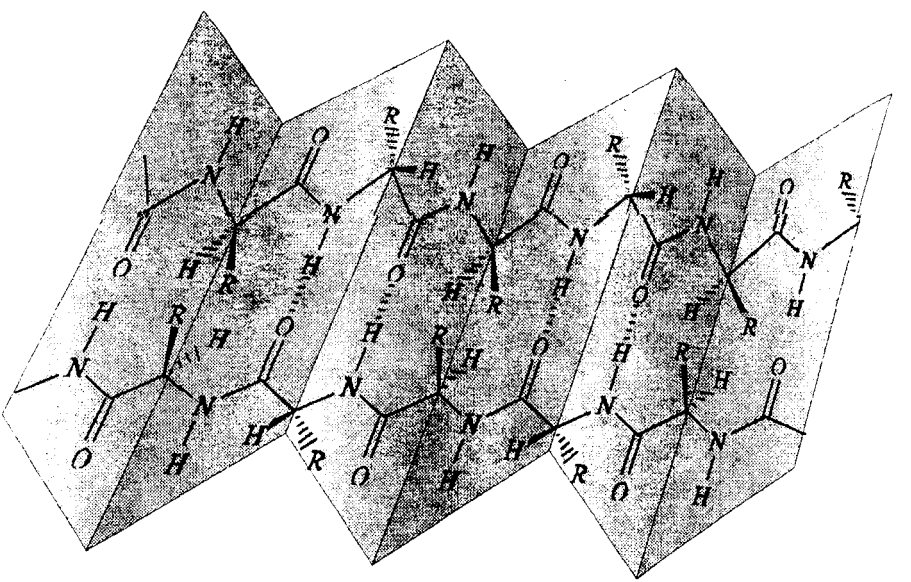


Fig. 3. 29. Modelul foi pliate (plisate)

Spre deosebire de modelul α-helix, format pe o porțiune continuă de catenă, modelul β sau foi pliate este construit pe baza mai multor regiuni dintr-o catenă polipeptidică. Acest model ideal conține secvențe de 5–10 aminoacizi ca lungime, unghiurile Ψ și Φ, situându-se în plaja –90° → –180° pe diagrama Ramachandran.

Dacă structura α-helixului se stabiliza prin legături de hidrogen între aminoacizii n și n+4, în cazul modelului de foi pliate, stabilizarea prin legături de hidrogen se face între porțiuni mai îndepărtate (în sensul structurii primare), dar care prin plieri ale catenei vin una în apropierea celeilalte. Planeitatea legăturii peptidice precum și apropierea dintre porțiunile de catene unite prin legături de hidrogen, conduc la planuri comune catenelor unite structura căpătând aspectul unei foi pliate în zona atomilor de carbon α, de unde și numele modelului. După sensul C→N a două porțiuni de catenă unite prin legături de hidrogen distingem modelul paralel și modelul antiparalel (*Fig. 3.29.*).

În modelul antiparalel, distanțele dintre legăturile de hidrogen nu sunt egale existând o alternanță între acestea, spre deosebire de modelul paralel în care distanțele dintre legăturile de hidrogen sunt egale (*Fig. 3.29.*).

Aceste structuri pure, precum α-helixul se pot combina între ele existând porțiuni β, care conțin amestecuri de „subporțiuni" β-paralele, precum și β-antiparalele.

Joncțiunea dintre catene prin care se realizează structurile stabilizate de tip foaie plisată diferă între modelul antiparalel și cel paralel. Între catenele antiparalele legătura se face printr-o porțiune peptidică care realizează o întoarcere simplă sau în ac de păr (hair pin).

Pentru realizarea foilor plisate de tip paralel, întoarcerile simple ale catenei polipeptidice sunt însoțite de răsucirea uneia dintre catenele polipeptidice. Aceste răsuciri nu pot fi decât de dreapta, din rațiuni care țin de chiralitatea aminoacizilor constituenți. Aceasta constituie o regulă de la care face excepție structura *subtilisinei* (o enzimă proteolitică din *Bacillus subtilis* și glucozofosfat izomeraza, o enzimă glicolitică care izomerizează esterul glucozo 6-fosfat în esterul fructozo 6-fosfat.

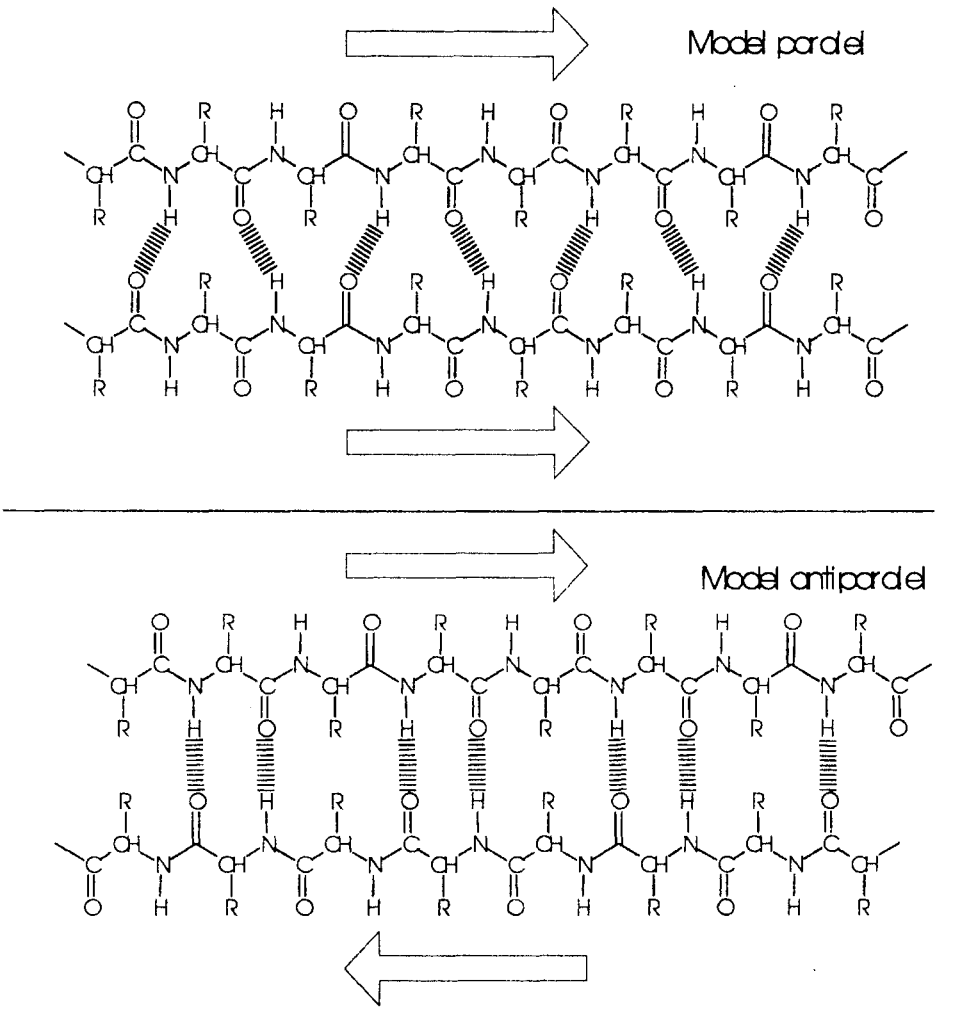


Fig. 3. 30. Modelul paralel şi modelul antiparalel al foilor pliate beta

Din analiza unui mare număr de date de difracţie a razelor X, Peter CHOU şi Gerald FRASMAN au dedus în 1984, pe baza frecvenţei identificării fiecărui aminoacid la o structură de tip α sau β, o ierarhie a participării aminoacizilor la aceste structuri (*Fig.3.31.*). Această ierarhie poate fi utilizată în predicţia structurii adoptate de diferite secvenţe din catenele polipeptidice. În acord cu aceste frecvenţe cuantificat prin tendinţa α (Tα) şi tendinţa β (Tβ), cei doi au sistematizat aminoacizii în şase categorii: tendinţă puternică (P), medie (M), slabă (S), indiferentă (I), tendinţă puternică de destabilizare a structurii (DP), respectiv tendinţă slabă de destabilizare (DS) – *Tab.3.4.*

Tab.3.4. Proprietăţile CHOU - FASMAN ale aminoacizilor

Aminoacid	T	Ierarhizare	T	Ierarhizare
A, Ala	1.42	P	0.83	I
C, Cys	0.70	I	1.19	M
D, Asp	1.01	S	0.54	DP
E, Glu	1.51	P	0.37	DP
F, Phe	1.13	M	1.38	M
G, Gly	0.57	DP	0.75	DS
H, His	1.00	S	0.87	M
I, Ile	1.08	M	1.60	P
K, Lys	1.16	M	0.74	DS
L, Leu	1.21	P	1.30	M
M, Met	1.45	P	1.05	M
N, Asn	0.67	DS	0.89	I
P, Pro	0.57	DP	0.55	DP
Q, Gln	1.11	M	1.10	M
R, Arg	0.98	I	0.93	I
S, Ser	0.77	I	0.75	DS
T, Thr	0.83	I	1.19	M
V, Val	1.06	M	1.70	P
W, Trp	1.08	M	1.37	M
Y, Tyr	0.69	DS	1.47	P

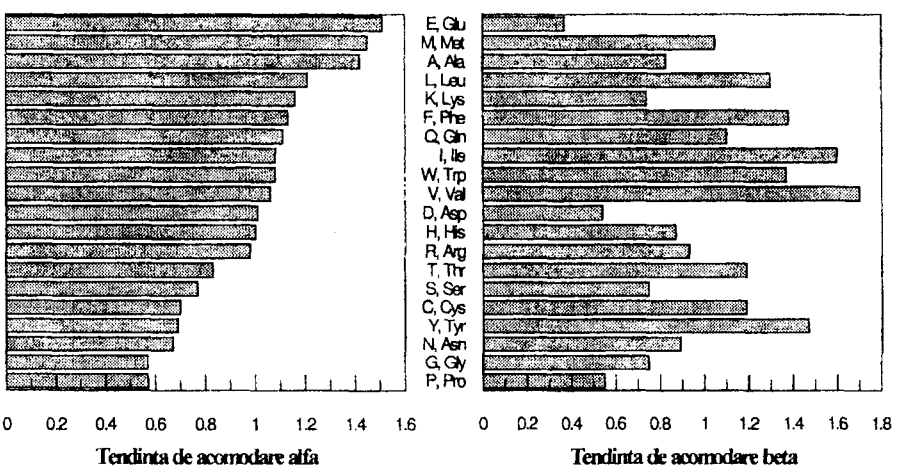


Fig. 3. 31. Tendinţe de acomodare ale aminoacizilor cu structura α-helix sau foaie β

3.5.3. Structuri suprasecundare şi domenii

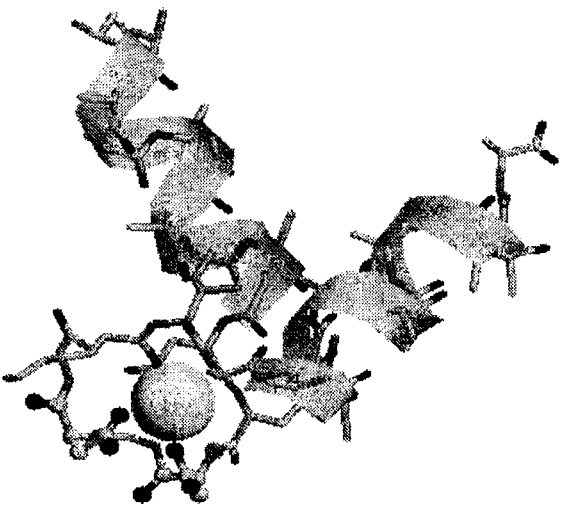


Fig. 3. 32. Parvalbumina cu ionul Ca^{2+} ataşat

Asamblarea structurilor secundare succesive se face într-un număr limitat de posibilităţi; organizarea locală a acestor structuri se poate include ca aspect particular, de detaliu, în structura terţiară, sau se poate delimita ca nivel distinct, între structura secundară şi terţiară. Literatura este încă diversă privind numele acestor structuri suprasecundare. Pentru acestea se folosesc termeni în sens sinonim ca: **motiv** sau **structuri secundare nerepetitive**. Literatura menţionează trei tipuri de **motive simple** αα, ββ şi motivul βαβ. Aceste motive simple se pot combina între ele, rezultând **motive complexe**. Motivele complexe sunt sistematizate în trei mari tipuri: all-α, all-β şi mixte αβ. Atunci când motivul capătă o stabilitate şi identitate (individualitate) structurală ori funcţională el defineşte un **domeniu**[14]. Acesta poate avea o funcţionalitate distinctă în cadrul catenei polipeptidice. Domeniul poate funcţiona similar cu o catenă polipeptidică. Exemplul sintezei acizilor graşi care se realizează de către şase enzime diferite este edificator.

[14] Trebuie menţionat că termenul de domeniu este folosit în unele tratate în sens sinonim cu acela de motiv complex, adică de asociaţie de mai multe motive simple, fără autonomie structurală şi funcţională.

3.5.3.1. Motivul αα sau helix - buclă- helix (HLH)

Constă din două helixuri unite printr-o regiune nehelicată. Lungimea acestei regiuni diferă. Motivul poate fi asociat cu o funcție specifică exercitată de catenă precum în cazul proteinelor care se leagă de ADN (vezi interacțiunea proteine ADN), ori a proteinelor care leagă calciul. Alteori catena care conține motivul nu posedă o funcție biochimică specifică, ci este integrată în ansambluri structurale sau funcționale.

Foarte studiat este exemplul proteinelor de legare a calciului. Primul studiu structural a fost făcut pe **parvalbumină**, o proteină monocatenară din mușchi, în 1973 de către KRETSINGER, care i-a determinat structura prin difracție de raze X. Motivul HLH, a fost numit de autor mână EF[15] (EF hand). Calciul se leagă în regiunea de buclă prin intermediul a două grupări carboxil provenind de la resturi de Asp respectiv Glu, de un carbonil din catena principală a regiunii de buclă și de o moleculă de apă. Și celelalte două proteine principale care leagă calciul au o structură asemănătoare a motivului HLH. Este vorba de **troponina C**, tot din mușchi și de **calmodulina**, o proteină extrem de comună, cu rol în reglarea concentrației calciului celular, în modularea unor enzime și a unor proteine de transport.

Pe lângă motivele simple, HTH sau HLH[16] se mai cunosc și motive multihelix întâlnite în cazul structurilor proteinelor membranare (receptorii membranari heptahelicoidali, precum rodopsina, reprezintă o clasă importantă de proteine α). În aceste tipuri de proteine helixurile interacționează reciproc fie prin intermediul unui ligand, fie direct prin intermediul unor zone de contact hidrofobe. Tot aici mai poate fi amintit modelul mănunchiurilor de patru helixuri exemplificat de feritină. Proteina conținând cele patru helixuri, expune spre exterior, în mediul apos zone hidrofile, în timp ce în zonele de contact dintre cele patru helixuri sunt prezente resturi hidrofobe de aminoacizi.

---

[15] numele provine de la faptul că cele două helixuri erau notate EF precum și datorită faptului că aspectul motivului sugera degetele mare respectiv arătător de la mâna dreaptă.

[16] Buclă este traducerea termenului englez de loop. HLH este deci acronimul termenului *h*elix-*l*oop-*h*elix. Atunci când lungimea buclei este mai mică (cazul proteinelor care leagă ADN-ul, ea se numește întoarcere (turn), motivul fiind cunoscut sub numele de HTH (*h*elix-*t*urn-*h*elix)

3.5.3.2. Motivul ββ sau agrafa (cotul) β

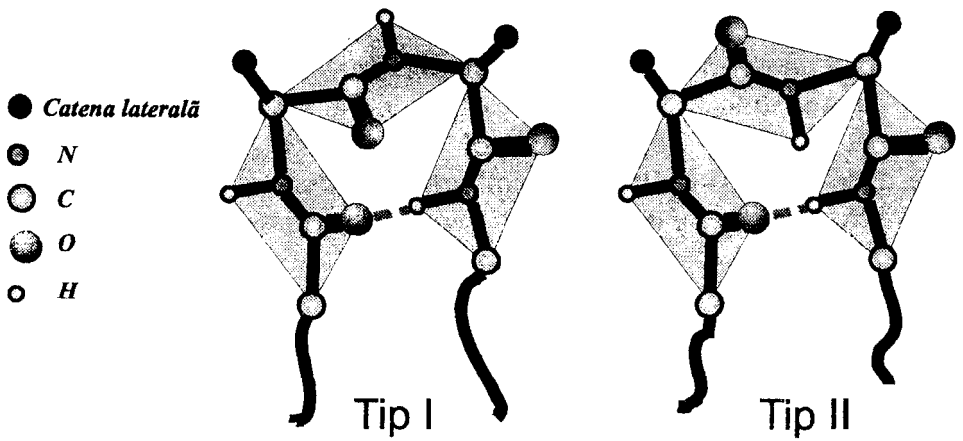


Fig. 3. 33. Agrafa sau cotul beta

Este cel mai simplu motiv care implică două catene beta. Majoritatea structurilor beta antiparalele îl conțin. Lungimea agrafei este în general cuprinsă între 2–5 aminoacizi. Cel mai simplu tip de agrafă beta este cea cu două resturi de aminoacizi. În funcție de natura joncțiunii dintre acești doi aminoacizi agrafa poate fi de tip I sau II (*Fig.3.33.*). Celelalte modele de agrafe sunt similar construite cu agrafa din doi aminoacizi. Se mai cunosc structuri antiparalele sucesive interesante. Unul dintre acestea este:

Motivul cheie grecească

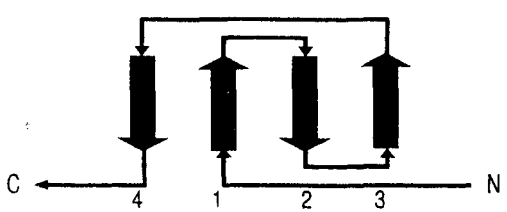


Fig. 3. 34. Motivul cheie grecească

Motivul cheie grecească este o variantă a motivului ββ (*Fig.3.34.*); se referă la dispunerea a patru foi beta, antiparalele și la conexiunile dintre ele într-o topologie care amintește de motivul decorativ întâlnit în construcțiile și îmbrăcămintea din Grecia antică. Se pare că acest motiv derivă dintr-un motiv clasic ββ, care este pliat după un plan care trece simultan prin ambele foi. Exemplul tipic de motiv cheie grecească se găsește în nucleaza din *Stapylococus*. Astfel de motive se pot regăsi și în *plastocianină*, o proteină ce face parte din catene de transport electronic din organismele fotosintetizante, precum și în structura anticorpilor. Structuri ale dispunerii foilor beta antiparalele sunte redate în *Fig.3.35.* Un model

particular de foi beta antiparalele este acela de „supra" cheie grecească, găsit în virusul satelit al necrozei tabacului (*Fig.3.35. B*).

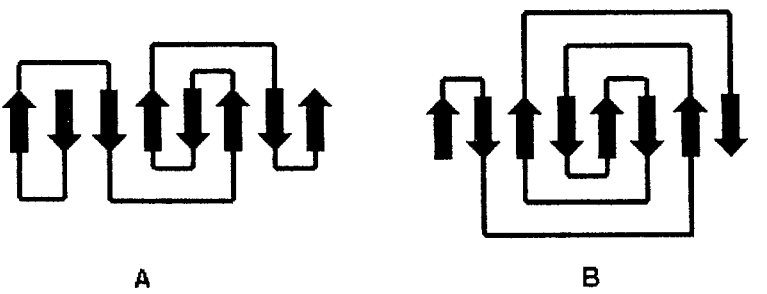


Fig. 3 35. Structuri complexe care conţin motivul cheii greceşti

3.5.3.3. Motivul beta - alfa - beta (βαβ)

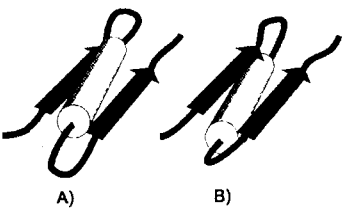


Fig. 3.36. Motivul βαβ. A) motivul cel mai răspândit de macrohelix βαβ de dreapta B) motiv cu macrohelix βαβ de stânga întâlnit doar în subtilizină

este cel de-al treilea motiv fundamental. El realizează joncţiunea dintre două foi paralele prin intermediul unui alfa helix. Principial, această legătură se poate face în două moduri, „macrostructura" de helix rezultată putând fi de dreapta sau de stânga. Cu o singură excepţie, subtilizina[17], motivul βαβ este un macrohelix de dreapta (*Fig.3.36. A*).

Acest motiv se găseşte în majoritatea structurilor proteice care posedă foi beta paralele. Axele helixurilor sunt aproximativ paralele cu foile beta. Helixul maschează resturile hidrofobe ale aminoacizilor din foile beta. Regiunile de buclă ce conectează structurile β şi α au lungimi diferite (de la două până peste 100 aminoacizi). Bucla care leagă capătul C-terminal al foii beta de capătul N-terminal al helixului are de regulă funcţie de recunoaştere. Ca exemplu de astfel de motiv complex se citează *fosfotriozoizomeraza,* o enzimă din calea glicolitică construită

[17] Subtilizina este o enzimă proteolitică extrasă din *Bacillus subtilis*; aici se întâlneşte motivul βαβ în configuraţie de macrohelix de stânga.

prin repetarea motivului βαβ. Două motive succesive utilizează în comun o foaie beta, astfel încât structura enzimei apare ca o succesiune $(\beta\alpha)_8$.

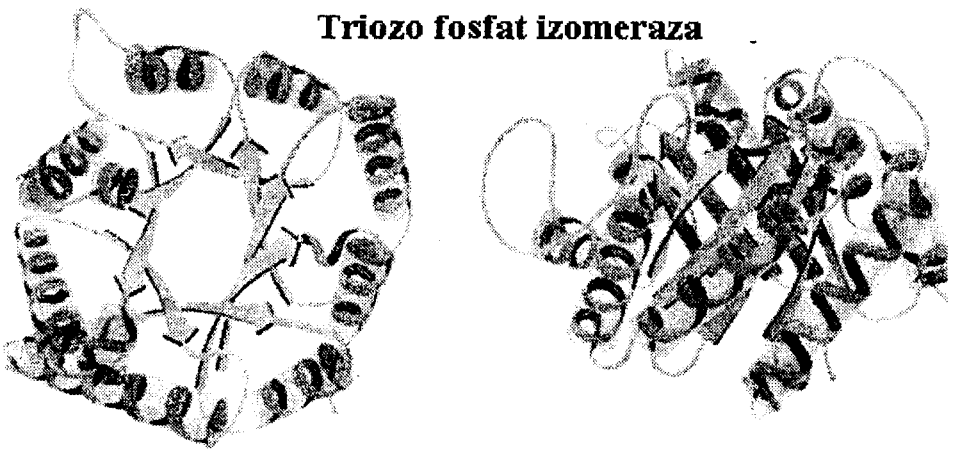


Fig. 3. 37. Modelul „butoi" al fosfotriozoizomerazei

Structura din *Fig. 3.37.* este reprezentarea văzută de sus și cea laterală a *triozofosfat izomerazei.* Astfel, catenele beta, ușor torsionate, vor avea o orientare paralelă, precum doagele unui butoi[18], helixurile de joncțiune fiind plasate în exteriorul acestei structuri tridimensionale. Astfel de modele sunt destul de răspândite.

Domenii structurale

Multe proteine posedă funcții multiple. Unei anumite funcții îi este asociată o porțiune din catena polipeptidică. Aceasta definește un **domeniu structural sau un modul.** Cazul dehidrogenazelor NAD^+ dependente este tipic. Toate posedă o zonă în care are loc atașarea NAD^+-ului pe lângă una sau mai multe zone în care are loc atașarea substrat-ului (-urilor) sau a eventualilor efectori alosterici (vezi enzime alosterice).

Lactat dehidrogenaza, glicerinaldehidfosfat dehidrogenaza, alcool dehidrogenaza și malat dehidrogenaza, ca exemple menționate posedă domenii specifice de legare a NAD-ului.

De asemenea cazul anticorpilor este bine cunoscut (vezi secțiunea anticorpi). Aceștia conțin domenii constante și domenii variabile, bine delimitate în spațiu.

[18] In engleză motivul este cunoscut sub numele de barrel - butoi

Domeniile structurale se pot sistematiza după tipurile predominante de structuri secundare care le compun. (all-alfa, all-beta precum şi mixte: alfa-beta).

3.5.4. Structura terţiară a proteinelor

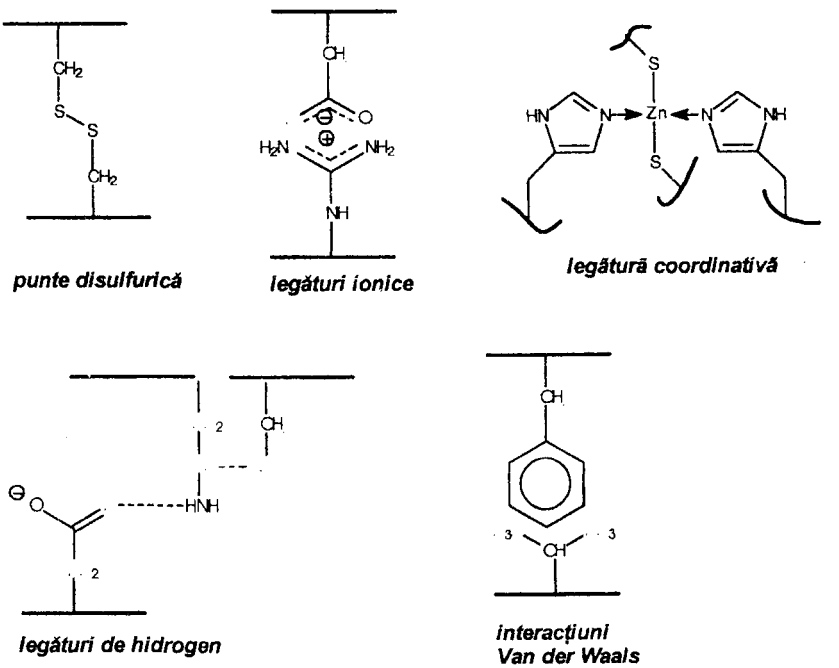


Fig. 3. 38. Interacţiuni care stabilizează structuri terţiare

Se referă la organizarea de ansamblu a catenelor polipeptidice în spaţiul tridimensional. Organizarea spaţială a proteinelor este dată de complexul de interacţiuni între catenele laterale ale aminoacizilor adiacenţi sau nu. Pentru o structură primară dată, posibilităţile relativ limitate de realizare a legăturilor de hidrogen caracteristice structurii secundare sunt completate de o diversitate combinatorială a interacţiunilor intracatenare. Funcţiile proteinelor sunt legate nemijlocit de aceste interacţiuni.

Paleta forţei legăturilor implicate în structura terţiară se întinde de la legăturile covalente caracteristice punţilor disulfurice realizate între resturi de cisteină şi se termină cu interacţiunile Van der Waals de dispersie dintre resturile apolare ale aminoacizilor hidrofobi (*Fig.3.38*).

Punțile disulfurice. Se stabilesc între grupările tiolice libere ale resturilor de cisteină. Datorită energiei de legătură ridicate (30 kcal· mol^{-1}), contribuie într-o măsură foarte ridicată la stabilitatea termică a proteinelor. De aceea se întâlnesc în special la proteinele secretorii (anticorpi, enzime digestive, transportori etc.). Prezența cisteinei nu presupune obligatoriu existența punților disulfurice. Așa cum se știe sunt extrem de sensibile la acțiunea oxidanților. De aceea analiza substanțelor proteice trebuie făcută de o manieră care să evite artefacturile. Aceasta înseamnă că trebuie evitați oxidanții care să oxideze grupările tiolice și totodată reducătorii care pot reduce legăturile disulfurice.

Legăturile ionice. Se stabilesc între resturile ionizate de semn contrar. Cele anionice sunt date de grupările carboxil ale acizilor aspartic și glutamic și cele cationice provin de la grupările NH_2 ale lisinei, argininei, mai rar de la histidină și triptofan. Și aceste legături sunt deosebit de puternice (energia de legătură fiind de ordinul 10 - 20 kcal · mol^{-1}) și la fel ca și în cazul punților disulfurice nu sunt frecvente.

Legăturile coordinative. Se întâlnesc în cazul metaloproteinelor. Metalul este coordinat de regulă de atomi de azot (energia de legătură este mai scăzută decât în cazul legăturilor ionice: 4 - 5 kcal · mol^{-1}).

Legăturile de hidrogen caracteristice structurilor terțiare se stabilesc între atomii de oxigen și azot ai resturilor OH, C=O, NH_2, pe de o parte și atomi de hidrogen mobili (hidroxil, amino). De reținut că nu se includ legăturile de hidrogen caracteristice structurilor secundare. Energia lor este redusă (2–6 kcal · mol^{-1}), dar contribuția lor este importantă prin numărul mare al legăturilor existente la un moment dat.

Legături (forțe) Van der Waals de orientare (interacțiuni polare). Aceste interacțiuni se stabilesc între resturile polare ale aminoacizilor fără a implica legăturile de hidrogen (cisteină - serină etc.). Energia lor este încă mai redusă, depinzând de distanța dintre centrele care interacționează.

Legături (forțe) Van der Waals de dispersie (interacțiuni hidrofobe). De o tărie individuală extrem de redusă, se stabilesc între resturile nepolare ale aminoacizilor neutri apolari și sunt extrem de importante deoarece asigură, prin numărul lor ridicat, stabilitatea edificiului proteic în interiorul acestuia, la adăpost de mediu.

Substanțele proteice se găsesc într-un mediu esențialmente polar. În prezența acestuia grupările hidrofobe tind să se aglomereze în interior, iar cele polare spre exterior. Această organizare are ca efect o *scădere a entropiei.* Această scădere este compensată parțial prin *scăderea ental-*

piei ca urmare a stabilirii interacțiunilor polare și hidrofobe pe de o parte, iar pe de altă parte prin *reducerea le minim a suprafeței de contact* între zonele hidrofobe-hidrofile, astfel încât final, întreg procesul de „pliere" (folding) este spontan deci caracterizat prin variația negativă a energiei libere.

Evaluarea stabilității unui agregat proteic în cazul particular al enzimelor se face prin determinarea temperaturii Tm (m de melting point – temperatură de topire) la care are loc scăderea la jumătate a activității enzimatice. Aceasta prin analogie cu temperatura de topire a unui cristal, care se află în corelație directă cu stabilitatea structurii sale. În acest context sunt de referință studiile echipei lui MATTHEWS de la Universitatea din Oregon (1988), care au lucrat pe *lizozimul bacteriofagului T4*. Lizozimul este o enzimă hidrolitică capabilă să scindeze peretele peptidoglicanic al bacteriilor, preludiu al intrării ADN-ului viral în celula gazdă. Această substanță își are analogul în lizozimul din albușul de ou, al cărui rol este de această dată protector, permițând distrugerea bacteriei. Diferența este de masă moleculară.

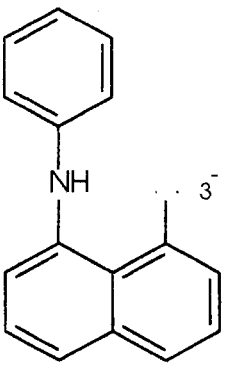
În proteina nativă, aminoacidul din poziția 3 este izoleucina. Modificându-se prin tehnici de inginerie genetică, succesiv leucina cu alți aminoacizi, măsurând de fiecare dată Tm și realizând studiul cu raze X al proteinei noi obținute s-a constatat că în toate cazurile are loc o scădere a valorii Tm. Înlocuirea cu aminoacizi cu volum mai mic (valină, alanină) creează spații vide care produc scăderea Tm odată cu dimensiunea acestora. Înlocuirea cu aminoacizi cu volum mai mare și totodată hidrofili, precum tirozina, duce la modificarea conformației proteinei astfel încât porțiunea hidrofilă să fie expusă în exterior, cu scăderea și mai accentuată a stabilității (*Tab.3.5.*)

Tab.3.5. Variația temperaturii Tm cu modificarea izoleucinei 3 cu alți aminoacizi

Aminoacid poziția 3	**Tirozină**	**Alanină**	**Valină**	**Izoleucină**
Tm [°C)]	58.8	62.9	63.5	64.7

Determinările au fost realizate la același pH (6,5).

O altă posibilitate de investigare a hidrofobicității unei anume ambianțe este utilizarea sondelor fluorescente. O astfel de sondă fluorescentă este *acidul 8-N-fenilaminonaft-1-il sulfonic (ANS).* (*Fig.3.39*).



Acidul 8-N-fenilamino-naft-1-il sulfonic

Fig. 3.39. Model de sondă de fluorescență utilizată la studiul structurii proteice

Analiza fluorescenței acestei substanțe introduse în molecula proteică ne poate furniza informații asupra ambianței în care se găsește substanța. Astfel:

♦ intensitatea fluorescenței este cu atât mai mare cu cât solventul în care se face determinarea este mai puțin polar. Aceasta datorită faptului că solvenții polari preiau o parte din energia radiației incidente care se disipă prin modificarea polarizării, reducând astfel randamentul cuantic al procesului.

♦ lungimea de undă a radiației fluorescente este mai mică în cazul unei ambianțe hidrofile (polare) deoarece prin interacțiune cu sonda de fluorescență, desigur dependentă de distanță, o parte din radiație preluată de aceasta este folosită la modificarea polarizării ambianței.

Cu ajutorul acestor sonde sau cu substanțe fluorescente existente sub formă de cofactori (NAD, piridoxal, flavine) se pot obține astfel informații legate de:

♦ topologia ambianței (prezența unui anume cromofor în apropiere)

♦ modificări conformaționale (termice, sau legate de modificări de pH)

♦ mobilitatea sondei. Aceasta se evaluează prin trimiterea unui impuls de durată extrem de scurtă (nanosecunde) a unei radiații luminoase polarizate. Prin evaluarea dispersiei radiației emise de cromofor se poate estima gradul de mobilitate al acestuia.

3.5.5. Structura cuaternară

Este caracteristică celor mai complexe proteine. Ele se găsesc sub formă asociată, prin *interacțiuni intercatenare.* Fiecare catenă polipeptidică poartă numele de *protomer,* structura rezultată prin din interacțiunea acestora fiind un *oligomer.* După identitatea sau nu a protomerilor ce compun oligomerul distingem homooligomeri sau heterooligomeri. De exemplu hemoglobina este un o substanță cu structură cuaternară formată din patru catene de două tipuri α și β. Se spune că hemoglobina este un heterodimer și se notează cu $\alpha_2\beta_2$. Legăturile dintre catene sunt în majoritatea cazurilor necovalente, fapt care permite separarea electroforetică a protomerilor. Pentru evitarea oricăror surprize, în vederea electroforezei este necesară reducerea prealabilă a eventualelor punți disulfurice și blocarea apoi a acestora cu iodoacetamidă. Electroforeza proteinelor multimerice presupune deci:

- precipitarea cu acid tricloroacetic
- centrifugarea
- tratarea precipitatului cu tampon conținând mercaptoetanol 10 mM și SDS, 2%.
- încălzirea amestecului câteva minute la 100° C
- depunerea a 10–50μl pe gel.
- electroforeza propriuzisă.

Masa moleculară a oligomerului se poate determina în prealabil prin gel-filtrare, pe o coloană calibrată, asumându-ne rezerva abaterii proteinei de la forma sferică, și de la densitatea medie de 1,36. Evident masa molară a protomerilor se determină prin electroforeza realizată, folosindu-se un amestec etalon de polipeptide.

3.5.6. Considerații generale privind stabilitatea structurii proteinelor

Procesul de structurare a proteinelor este guvernat de interacțiuni care se realizează între componentele proprii edificiului proteic pe de o parte și interacțiuni care se realizează între componentele edificiului proteic și mediu. Procesul este spontan atunci când variația de entalpie liberă este negativă (conținutul de energie liberă scade).

Gradul înalt de organizare, paleta extrem de largă a tăriei interacțiunilor care îl definesc, fac din proteine un *edificiu extrem de fragil* a cărui existență reclamă condiții de ambiant foarte restrictive (temperatură, pH, tărie ionică, lipsă ioni chelatanți străini).

Structura dată a proteinelor este premisa activității lor biologice. Odată alterată, această structură își pierde capacitatea funcțională. Agenții care produc o astfel de alterare modifică local sistemul de interacțiuni interne proprii proteinei. Ei se numesc ***agenți denaturanți***. În funcție de întinderea 'distrugerilor' produse de aceștia denaturarea poate fi *reversibilă*, proteina putând reveni la structura sa inițială, sau *ireversibilă*. Din prima categorie fac parte denaturanții care acționează la nivelul legăturilor slabe (Van der Waals, legături de hidrogen). Aceștia pot fi soluțiile saline care modifică tăria ionică respectiv pH-ul. Odată îndepărtați din mediu (printr-o tehnică oarecare - dializă, gel filtrare etc.), proteina poate reveni la structura inițială. O mențiune aparte trebuie făcută în cazul sulfatului de amoniu. Soluțiile acestei săruri sunt folosite pentru precipitarea fracționată a proteinelor (deoarece prin modificarea locală a interacțiunilor, în special cele care privesc grupele polare are loc scăderea solubilității). Prin îndepărtarea ionilor proteina devine din nou la starea inițială. Denaturarea ireversibilă are loc cu agenți care duc la formarea unor legături stabile. În acest caz revenirea la structura inițială nu mai este posibilă. Dintre acești agenți menționăm *acizii minerali* concentrați (H_2SO_4, HCl), unii *acizi organici* (acidul tricloroacetic, acidul sulfosalicilic, acidul picric), aceștia fiind folosiți în laboratoarele de biochimie pentru deproteinizarea materialelor biologice în vederea izolării sau modificării altor componente. De asemenea produc denaturare ireversibilă *ionii metalelor tranziționale*, prin formarea unor legături coordinative, de asemenea *temperatura* și *acțiunea mecanică*.

Așa după cum s-a afirmat, structura reprezintă premisa activității biologice. Dar această afirmație nu trebuie să conducă la concluzia că molecula proteică acționează într-o formă rigidă. Faimoasa teorie lacăt - cheie vehiculată până în anii 70 a fost înlocuită cu teoria ajustării induse sau teoria ***mobilității conformaționale a proteinelor***. Acțiunea lor biologică constă într-o interacțiune la nivel molecular cu alte structuri organice. Ori aceste interacțiuni pentru a se putea produce necesită o adaptare conformațională reciprocă (unghiuri și distanțe) în scopul minimizării factorului steric al ecuației cinetice a interacției. Aici studiul cu raze X al conformației proteice nu este de un ajutor deoarece surprinde molecula în stare rigidă.

O altă problemă este cea referitoare la ***tipul de structură*** adoptat de proteină. Se știe că structura unei substanțe este determinată de conformația la care energia liberă este minimă. Un experiment realizat de

ANFINSEN și WHITE în anul 1960 cu ribonucleaza pancreatică, i-a condus la concluzia că structura primară determină univoc toate celelalte tipuri de structuri, iar activitatea proteică depinde numai de această structură primară. Aceasta a fost cunoscută până nu de mult ca dogmă a structurii proteice. Experimentul lor a constat în tratarea ribonucleazei cu uree 8M și mercaptoetanol, când s-a obținut o denaturare a acestei enzime cu pierderea consecutivă de activitate. După îndepărtarea prin dializă a micromoleculelor și expunerea soluției proteice la aer s-a remarcat o renaturare a enzimei (*Fig.3.40*).

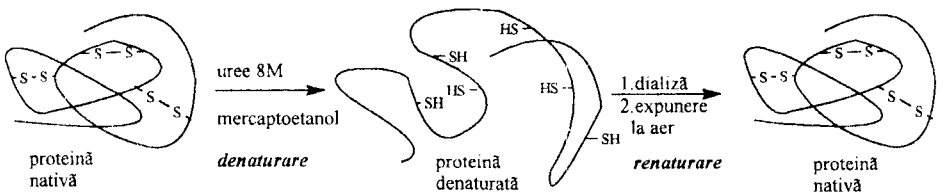


Fig. 3.40. Denaturarea și renaturarea ribonucleazei

Ori, în realitate, structura proteinelor în special a celor de tip oligomer nu respectă în totdeauna acest principiu. În cazurile de excepție, conformația activă este diferită de conformația cu energie minimă. Stabilitatea conformației active este dată de energia de activare ridicată care face posibilă tranziția.

3.5.6.1. Proteinele chaperon

Principiul elaborat de ANfiNSEN conform căreia structura spațială a proteinelor este determinată exclusiv de structura primară are și excepții în aplicare. S-au identificat proteine care supuse renaturării, după un proces de denaturare, nu mai revin la structura inițială deci nici la funcționalitatea inițială. Evident, cele două tipuri de structuri diferă prin legăturile intra- și intercatenare care se stabilesc. Ribonucleaza, pe al cărei studiu și-a fundamentat ANfiNSEN teoria, este o proteină cu masa relativ redusă, și de aceea procesul de structurare poate fi condus ușor, proteina revenind după denaturare la conformația corespunzătoare conținutului energetic minim. Existența proteinelor care nu pot fi renaturate „in vitro" a pus problema că aceste proteine posedă o structură care diferă de cea corespunzătoare minimului global al conținutului energetic. În acest caz, energia moleculei se plasează pe un minim local, iar trecerea de la acesta la minimul global evidențiat de ANfiNSEN ar presupune depășirea unei bariere energetice, prea ridicată pentru a fi compatibilă cu procesele vitale.

Între procesele de structurare „in vitro" şi cele „in vivo" există diferenţe notabile. „In vivo", concentraţia proteică locală este ridicată. Aglomerarea locului de structurare, la ieşirea din ribozom, poate fi cauza unor asocieri intercatenare neîntâlnite la procesul „in vivo", sau ale unor structurări intracatenare nonconforme cu funcţionalitatea proteică.

În aceste condiţii apare firească existenţa unor proteine care asistă activ, (îndrumă) procesul de structurare. De aici şi numele de proteine chaperon[19].

Mecanismul prin care este realizată asistenţa procesului de structurare nu este complet elucidat. Avându-se în vedere şi faptul că proteinele chaperon facilitează transferul proteinelor nou sintetizate din citosol în unele formaţiuni infracelulare definiţia următoare pare a fi acoperitoare: *Proteinele chaperon sunt proteinele care se leagă şi stabilizează un conformer, instabil în alte condiţii. Prin asocieri şi disocieri cu şi de pe proteina ţintă, îi determină destinaţia: fie prin structurare, fie prin asociere oligomerică, fie prin transport într-un compartiment infracelular ori prin comutare între conformaţii active respectiv inactive.*

Multe dintre proteinele chaperon sunt sintetizate în concentraţii ridicate la expunerea celulelor vii la stres termic, de unde şi denumirea de proteine de şoc termic (hspxx)[20].

Două familii de proteine de şoc termic sunt mai bine cunoscute: hsp60 şi hsp70.

La ieşirea din ribozom, catena polipeptidică în curs de sinteză, este preluată de **hsp70**, care se ataşează de catenă prin recunoaşterea unor secvenţe hidrofobe. Se pare că această ataşare a proteinei hsp70 este realizată doar în scopul evitării unor asociaţii neproductive. La încheierea procesului de sinteză proteina chaperon se detaşează, într-un proces ce presupune hidroliza ATP. Proteinele din clasa hsp70 posedă în porţiunea N-terminală o secvenţă conservată (cu structură primară foarte asemănătoare la diferite proteine hsp70) unde se află localizată activitatea ATP-azică[21]

---

[19] Chaperonine, în limba franceză semnifică o femeie care are rolul de îndrumătoare, iniţiatoare pentru tinerele fete.

[20] Heat shock proteins, xx reprezintă masa molară exprimată in kilodaltoni De exemplu hsp60, hsp70, hsp90 etc. Proteinele de şoc termic protejează prin ataşare proteinele de denaturarea datorată şocului termic sau altor surse de stress.

[21] De hidroliză a ATP-ului

În continuare, proteina nestructurată este preluată de hsp60. Structura **hsp60** se asemănă cu ce a unui butoi, fiind formată prin suprapunerea a două unități cu formă toroidală. Fiecare unitate este formată din șapte subunități fiecare cu masa de 60 de daltoni. Masa întregului ansamblu este deci de 2·7·60 = 840 kD.

Procesul de structurare, asistat de hsp60 presupune mai multe cicluri atașare-detașare a proteinei pe / de pe structura hsp60. Elementul activ este proteina hsp60 care pulsează (își mărește și își micșorează diametrul interior) ca urmare a unor procese de fosforilare, defosforilare. După mai multe runde de astfel de mișcări, proteina asistată va fi structurată în forma corectă, fiind eliberată din interiorul proteinei chaperon.

3.6. Sinteza chimică a catenelor polipeptidice (Merrifield 1963)

Obținerea prin sinteză a unor catene polipeptidice cu structură dată a devenit stringentă odată cu izolarea și determinarea structurii primare a analogilor naturali. Și aceasta din mai multe motive: În primul rând nevoia de mai mult material necesar studiilor de structură, proprietăți și acțiune biologică, atunci când costul obținerii din sursa naturală devine prohibitiv. Apoi, elaborarea pe baza relațiilor structură - acțiune a unor polipeptide cu funcționalitate modificată, utile în diferite scopuri. De asemenea, bazat pe proprietățile antigenice ale unor proteine, sinteza lor în vederea obținerii de anticorpi.

Reactivitatea mare a grupelor carboxil, amino, precum și a resturilor funcționale din catenele laterale, a complicat mult sinteza convențională, atât prin nevoia utilizării unor reactivi de blocare pentru grupele funcționale, dar mai ales prin procedurile sofisticate de purificare necesitate atât datorită reacțiilor incomplete dar și a celor secundare și, în final, randamentele scăzute care se micșorează vertiginos odată cu creșterea numărului resturilor aminoacil din molecula dorită. Toate aceste dificultăți au făcut din sinteza clasică, chimică un instrument greoi de lucru pentru cele mai mici catene și practic inutilizabil pentru catene cu un număr mai mare de 5–6 aminoacizi.

O alternativă genială prin simplitate a imaginat **MERRIFIELD**, într-o sinteză etapizată, realizată într-un sistem heterogen solid-lichid. Catena polipeptidică, în creștere, cu capătul N-terminal liber, se găsește atașată de un suport macromolecular solid. Soluția de aminoacid cu gruparea

amino blocată se adaugă în exces. În acest mod vor reacționa grupările amino și carboxil[22] libere. După formarea noii legături peptidice, excesul de aminoacid blocat se îndepărtează prin spălare. Se îndepărtează reactivul de blocare, reluându-se ciclul de sinteză prin adăugarea unui nou aminoacid N-blocat. Final, polipeptida se eliberează de pe suport.

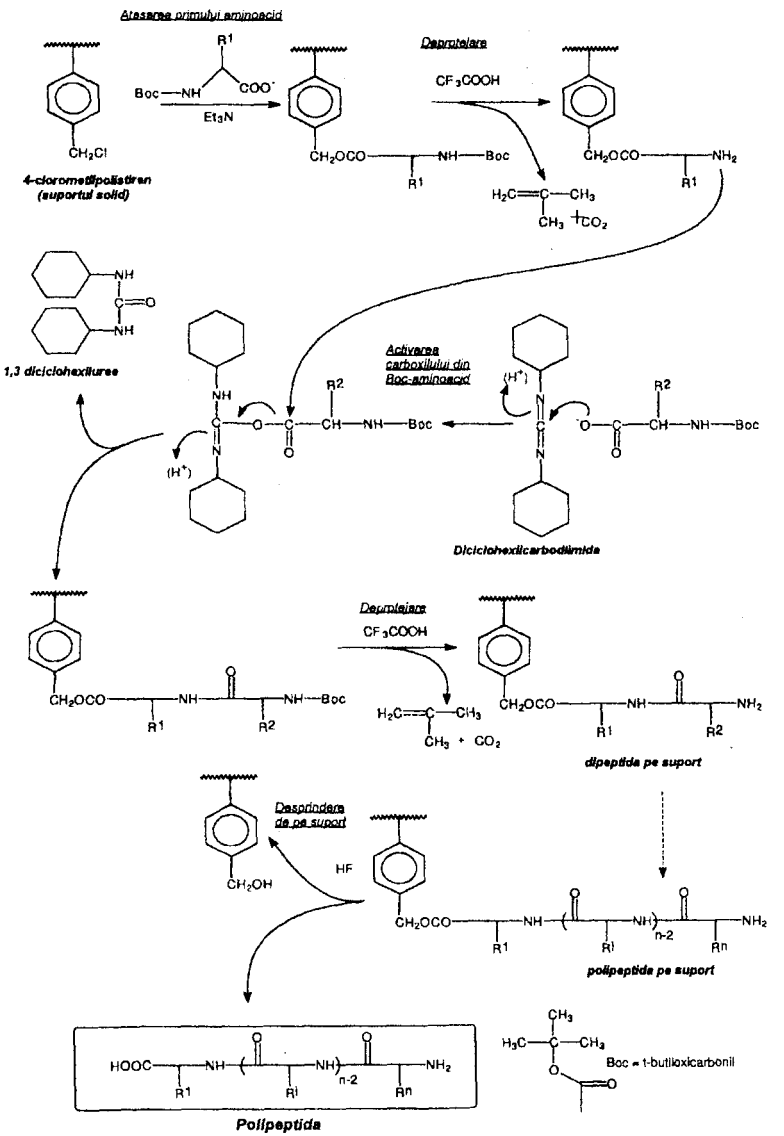


Fig. 3. 41. Schema de principiu a sintezei MERRIFIELD

[22] Gruparea carboxil se va activa cu DCC (Vezi mai departe).

Mersul reacției se poate urmări în *Fig. 3.41.* Drept suport solid, insolubil, se poate folosi, printre altele, polistirenul clorometilat (cu ajutorul clorodimetileterului). Pe acest polimer se atașează Boc-aminoacidul[23]. Îndepărtarea grupei blocante se face prin tratare cu acid trifloroacetic. Se va elimina izobutenă și CO_2, capătul amino rămânând liber să reacționeze cu capătul carboxil al monomerului următor N-blocat. Reacția presupune activarea grupării carbonil, care se realizează cu DCC (*di*cic*l*ohexil*c*arbodiimida). Îndepărtarea suportului se face prin tratare cu acid fluorhidric.

3.7. Proteine fibrilare

Structura tridimensională a unei proteine o poate plasa între proteinele globulare atunci când diametrul și lungimea structurii sunt de același ordin de mărime, respectiv proteine fibrilare în care raportul lungime pe diametru este mare. Proteinele fibroase, sunt formate din catene paralele aranjate fie în fibre, fie în foi cu lungime mare. Caracteristicile definitorii pentru proteinele fibroase sunt rezistența mecanică, și insolubilitatea în apă și soluții saline (diluate).

3.7.1. α-Keratina

Ca și analogul său β, se găsește în fanere (unghii copite, coarne, remarcându-se prin conținutul foarte mare de cisteină (22–24 %) și de asemenea de prolină.

Structura tridimensională a α-keratinei este reprezentată de *filamentele* de α-keratină. Fiecare filament este format din patru *protofibrile.* O protofibrilă este formată dintr-o pereche de *duplexuri monohelicoidale spiralate reciproc* (coiled coil).

In fiecare catenă există un segment central cu structură regulată α-helicoidală. Capetele acestuia sunt neregulate, atât sub aspectul compoziției cât și al lungimii. Structura principală constă dintr-un motiv repetitiv format din șapte tipuri de aminoacizi $(a\text{-}b\text{-}c\text{-}d\text{-}e\text{-}f\text{-}g)_n$. Aminoacizii a și d sunt de regulă hidrofobi, și ținând seama de numărul de 3,6 aminoacizi per spiră, acești aminoacizi formează un șir al cărui ax face un anume unghi cu axul helixului. Prezența resturilor hidrofobe desta-

[23] Tert *but*oxi *c*arbonil aminoacidul – formă cu gruparea amino blocată și cea carboxil liberă. Carboxilatul va ataca nucleofil legătura clorometilenică realizând substituția, în prezența trietilaminei ca bază.

bilizează porțiune din helix expusă la solventul apos. Prin asocierea helixurilor cu structură asemănătoare, astfel încât să se poată manifesta interacțiunea hidrofobă între aceste resturi („ascunse" cele două helixuri), structura rezultată va fi stabilizată. Stabilizarea respectivă, se poate realiza doar prin răsucirea reciprocă a helixurilor care vin în contact. Aceasta este de fapt explicația structurii suprahelicate a duplexurilor monohelicoidale, a protofibrilelor și a filamentelor. Legăturile intercatenare dintre structurile helicoidale sunt întărite de participarea punților disulfurice posibile datorită conținutului ridicat de sulf al α-keratinelor. Aceste punți disulfurice sunt obiectul propriuzis al muncii coafezelor care fac părul „permanent". În acest proces ele desfac inițial punțile disulfurice, folosind un compus tiolic de tipul acidului tioglicolic sau tiolactic, apoi aranjează părul după forma dorită, și intervin cu un oxidant care reface punțile disulfurice pe structura nou creată.

Prin încălzire, α-keratina se transformă în β-keratină ca urmare a reorientării legăturilor de hidrogen. În structura de tip beta catenele se orientează în foile pliate corespunzător modelelor beta cunoscute la structurile secundare.

3.7.2. Fibroina

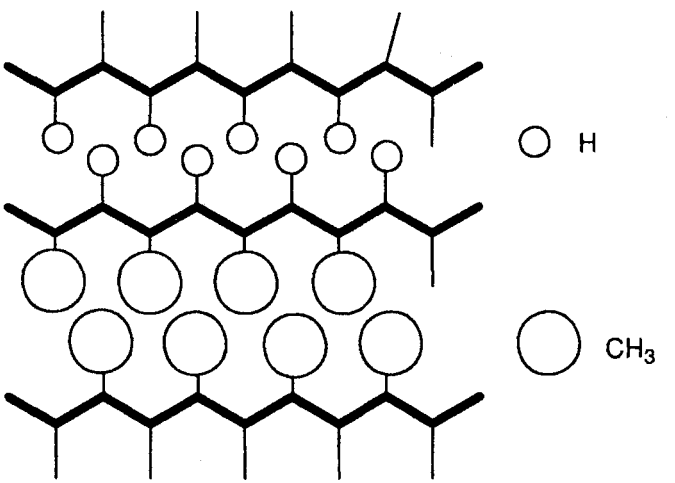


Fig. 3. 42. Structura stratificată a fibroinei

Este o proteină fibrilară produsă de viermele de mătase (*Bombix mori*). Structura sa este reprezentată de un ansamblu stratificat de foi

beta antiparalele. Structurile stratificate sunt posibile datorită conținutului ridicat de glicocol, care prin volumul minim al restului expus în afara planului (H), permite o apropiere între planuri. De asemenea în fibroină se remarcă și un conținut ridicat de alanină (al doilea aminoacid ca mărime după glicocol). Structuri stratificate de tip foi beta se întâlnesc în aripile păsărilor. Realizarea structurilor stratificate se bazează pe similaritatea zonelor care se găsesc la interfața planurilor. Este vorba de zone de contact extinse de glicocol alanină și mai rar serină (*Fig. 3.42.*)

3.7.3. Colagenul

În lumea vertebratelor, colagenul este cea mai răspândită proteină. Ponderea acesteia în totalul substanțelor proteice ale organismului, este de aproximativ 25 %. Numele, derivat din limba greacă semnifică: *generator de clei.* Se găsește în țesutul conjunctiv, alături de alte proteine înrudite ca elastina, fibronectinele, proteoglicanii. De asemenea este întâlnită în piele, tendoane, cartilagii, pereții vaselor de sânge, în matricea proteică a oaselor.

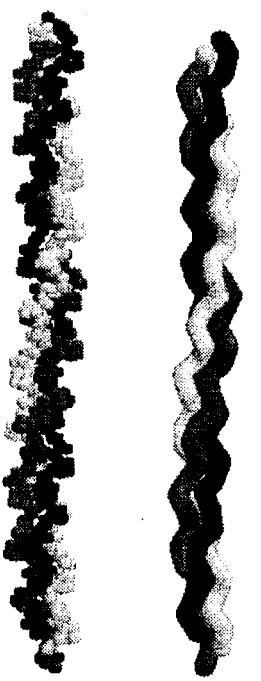


Fig. 3. 43. Modele ale triplului helix colagenic

Insolubilitatea colagenului a fost mult timp o piedică în calea studiului acestei substanțe. Impasul a fost depășit la constatarea că din țesutul conjunctiv al animalelor tinere poate fi extrasă o formă mai solubilă, cu grad de reticulare mai redus, formă numită **tropocolagen**. Această substanță formează un agregat trimeric cu masa de cca. 285 kD, cele trei catene, - fiecare constituită dintr-un helix de stînga ! - fiind răsucite spre dreapta, în jurul unei axe comune. O „moleculă" de tropocolagen are lungimea de cca. 300 nm și un diametru de cca. 1,4nm. Fiecare din cele trei catene din tropocolagen participă cu aproximativ 1000 de aminoacizi.

Se cunosc peste 12 tipuri structurale de colagen, fiecare diferind prin localizare, implicit prin structura de detaliu și funcționalitate (*Tab.3.6* după APPS –1991).

Tab.3.6. Principalele tipuri de colagen şi caracteristicile acestora

Tip	Catene			Localizare tisulară
	1	2	3	
I	α1(I)	α1(I)	α2(I)	piele, oase, tendoane, plămân, vase sangvine, corneee
II	α1(II)	α1(II)	α1(II)	cartilagii, discuri intervertebrale, umoare vitroasă
III	α1(III)	α1(III)	α1(III)	piele, plămân, vase sangvine, tendoane, intestin
IV	α1(IV)	α1(IV)	α2(IV)	Membrane bazale
V	α1(V)	α2(V)	α3(V)	piele, vase sangvine, placentă, comee, tendoane
VI	α1(VI)	α2(VI)	α3(VI)	piele, vase sangvine, placentă, aorta
VII	α1(VII)	α1(VII)	α1(VII)	Piele
VIII	–	-	-	plamân, timus, inimă
IX	α1(IX)	α2(IX)	α3(IX)	cartilagii, cornee, umoare vitroasă
X	α1(X)	α1(X)	α1(X)	Cartilagii
XI	α1(XI)	α2(XI)	α3(XI)	Cartilagii
XII	–	-	-	Tendoane

Structura tuturor formelor de colagen este una de tip triplu helix. Monohelixurile sunt de stânga şi fiecare se supraspiralează înspre dreapta, peste alte două helixuri cu acelaşi comportament, în jurul unei axe comune (*Fig. 3.43*). Prin aceasta se obţine o structură ce explică marea rezistenţă mecanică a fibrelor colagenice. Un detaliu al compoziţiei chimice, face din colagen o substanţă aparte în lumea proteinelor: fiecare catenă din colagen conţine motivul repetitiv Gly-X-Y unde X şi Y sunt cu mare probabilitate *prolină*, respectiv *hidroxiprolină* (Hyp). Ca şi prolina, lisina se găseşte atât sub formă „normală" dar şi sub formă hidroxilată de 5 - hidroxilisină (Hyl).

Prezenţa hidroxilisinei, respectiv a hidroxiprolinei face posibilă stabilirea unor legături de hidrogen intercatenare în structura triplului helix, ceea ce îi măreşte considerabil rezistenţa. La procesul de hidroxilare al celor doi aminoacizi participă acidul ascorbic (*Fig.3.44.*). De altfel, unele manifestări ale carenţei în acid ascorbic, sunt datorate tocmai deficienţelor structurale ale colagenului cauzate de imposibilitatea rigidizării structurii sale prin punţi intercatenare.

Stabilizarea tropocolagenului se face şi prin legături covalente în care sunt implicate câte trei resturi de lisină. Sub acţiunea lisiloxidazei, o enzimă cupru-dependentă resturile de lisină se transformă în alisină, prin oxidarea carbonului ε din lisină şi pierderea amoniacului (*Fig.3.45*).

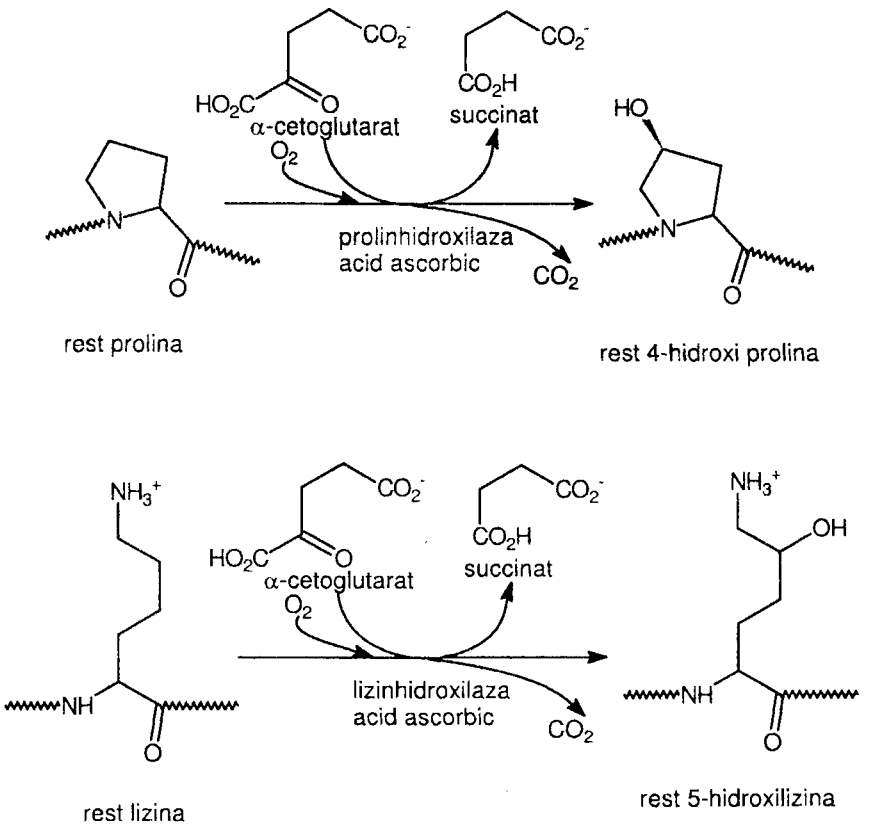


Fig. 3.44. Hidroxilarea aminoacizilor colagenici care participă la formarea de legături intercatenare

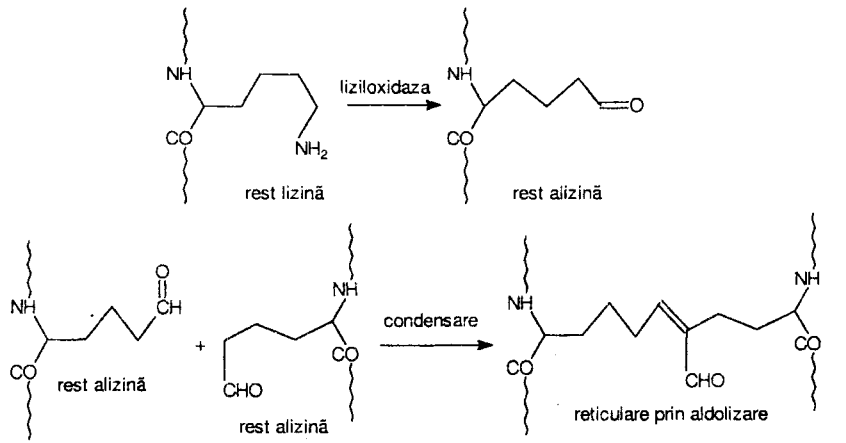


Fig. 3.45. Reticularea colagenului prin resturile de lizină

O altă posibilitate de stabilizare intercatenară este joncțiunea a două resturi de hidroxilizină cu un rest de lizină. Rezultă o structură de tip hidroxipiridiliu, care stabilizează trei catene. Acest tip de legătură intercatenară se realizează între regiunea N-terminală a unei unități tropocolagenice și regiunea C-terminală a unității tropocolagenice adiacente.

Spre deosebire de modelul α-helix, în monohelixurile colagenice nu întâlnim legături de hidrogen intracatenare. Stabilizarea monohelixului se face prin repulsia resturilor voluminoase de prolină și hidroxiprolină. Aceasta face ca distanța dintre aminoacizii adiacenți să fie mai mare decât la modelul α-helix.

Catenele de tropocolagen se asociază în **fibrile** care constau din mănunchiuri tropocolagen. Între catenele succesive de tropocolagen există un spațiu de cca. 40 nm. Acest spațiu servește atât ca zonă de inserție a unor oligoglucide (prin intermediul 5-hidroxilizinei) dar și ca centre de nucleație, unde se vor plasa cristale de hidroxiapatită, $(Ca_5(PO_4)_3OH)$ care vor forma țesutul osos.

3.8. Proteine globulare

3.8.1. Anticorpi

Vertebratele și-au dezvoltat sistemul imun care să le protejeze de paraziții patogeni (bacterii și virusi) și de asemenea de substanțele macromoleculare care pot pătrunde în organism. Fără acest sistem viața în condiții normale ar fi imposibilă. Dereglarea sistemului imun poate produce alterări ale funcționării întregului organism. Sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA sau AIDS – acronimul de la *A*quired *I*mmuno*d*eficiency *S*yndrome) este unul dintre cele mai dramatice efecte ale malfuncționării sistemului imun. Tot sistemul imun, de data aceasta în bună stare de funcționare, este răspunzător de dificilele probleme care apar în cazul transplantului de organe.

Sistemul imun își îndeplinește funcția de protecție prin:

- *recunoașterea specifică a moleculelor străine*, care presupune discriminarea între moleculele proprii (self) și cele străine (nonself). Aceste molecule pot pătrunde în organism independent, ori se pot găsi pe suprafața microorganismelor. În unele stări patologice, moleculele

proprii sunt recunoscute ca „străine", ceea ce generează așa numitele maladii autoimune.

- capacitatea distrugerii agenților străini
- *memoria acțiunii*, care facilitează un răspuns mai rapid la o acțiune ulterioară a aceluiași agent străin.

Sistemul imun recunoaște în structura străină, numită ***antigen***, un fragment molecular numit ***determinant antigenic*** sau ***epitop***. Recunoașterea celulară dintre determinantul antigenic (epitop) și situsul de legare al determinantului antigenic (**paratop**) se face prin stereocomplementaritate. La pătrunderea unui agent străin, sistemul imun poate declanșa două tipuri de răspunsuri. Fiecare dintre acestea este asociat unui tip de celulă limfatică:

1. **răspuns umoral**, prin intermediul unor proteine solubile, circulante, *anticorpii*, (numite și imunoglobuline, notate **Ig**), care fomează complexe cu antigenii. Anticorpii sunt sintetizați de către celule particulare, specializate, limfocitele B.
2. **răspuns celular**, prin intermediul altor celule specializate, limfocitele T.

Componentele de bază ale sistemului imun, limfocitele B și T se dezvoltă din celule tulpină (stem) odată cu toate celulele din sânge. Aceste celule tulpină sunt localizate mai întâi în *țesuturi primare hematopoietice* (măduva osoasă la adult, respectiv ficatul la fetuși). Celulele T, imature, migrează pe calea circulației sangvine la timus (de aici și numele de celule T), unde are loc maturizarea acestora, după care tot pe cale umorală ajung la *țesuturile limfoide secundare*. Celulele B migrează direct la țesuturile limfoide secundare, unde se vor forma celulele limfatice mature B[24]. Țesuturile limfoide secundare sunt reprezentate de nodulii limfatici, splina, țesuturile limfoide asociate epiteliilor din tractul gastrointestinal, respiratoriu și din piele.

Răspunsul umoral

Ca reacție la invazia antigenilor, în organele limfoide secundare și în circulația sangvină, apare o cantitate mare de anticorpi specifici agentului străin. Specificitatea recunoașterii cuplului anticorp - antigen este esențială. Natura stereocomplementară a acestei recunoașteri este similară recunoașterii enzimă - substrat. Diferența dintre aceste două tipuri de cupluri, este că enzimele s-au format în prezența substraturilor

[24] numele vine de la os: măduvă osoasă: *b*one marrow

corespunzătore, într-un proces evolutiv, a cărui măsură este durata vieții pe pământ, în timp ce anticorpii, reprezintă materializarea practic imediată a răspunsului unei agresiuni substanțiale. Există două teorii cu privire la acțiunea anticorpilor: (1) **teoria autoinstruirii** elaborată de Linus PAULING în 1940, și (2) **teoria selecției clonale**[25], elaborată de BURNET, JERNE, TALMAGE și LEDERBERG, în 1950. Potrivit teoriei autoinstriurii, antigenul servește ca matriță pentru plierea (structurarea) anticorpului în curs de biosinteză. Anticorpul va putea dobândi specificitatea interacțiunii cu un anume antigen doar în urma plierii catenei asistate de același tip de antigen. Această teorie a fost combătută mai întâi de către Christian ANFINSEN, care, ceva mai târziu a și postulat principiul univocității relației structură primară - structură spațială (secundară, terțiară ori cuaternară). Dovada experimentală a fost oferită prin demonstrarea faptului că anticorpii specifici pot fi produși în lipsa antigenului și prin observația că un tip de celulă limfatică B fabrică o singură specie de anticorpi. De aici s-a născut cea de-a doua teorie, (2) teoria selecției clonale. Această teorie atestă existența primordială a unei mari varietăți de anticorpi. Antigenul va selecta pe cel potrivit; în urma selecției se va stimula producția dirijată a clonei.

Diversitatea anticorpilor este extrem de mare, prin urmare și a limfocitelor de tip B. Inițial anticorpii limfocitelor B se găsesc dispuși pe suprafața celulei, prin inserție membranară.

Fiecare celulă posedă pe suprafața sa cca. 10^5 molecule de anticorpi. Anticorpii legați au capacitatea de a recunoaște și de a lega moleculele solubile sau cele existente pe suprafața microorganismelor invadante. Prin legarea antigenului, celulele B vor fi stimulate să prolifereze și să producă mari cantități de anticorp, identic cu cel care a fost legat. Acești anticorpi vor putea fi secretați. O limfocită B matură poate să producă cca. 2000 molecule de anticorp / secundă.

3.8.1.1. Structura anticorpilor

Anticorpii sunt structuri mono- di- sau pentamerice. Unitatea de bază are forma literei Y și posedă situsuri identice de legare a antigenului pe fiecare braț. De aceea anticorpii monomerici (IgG, IgD și IgE - vezi în continuare) sunt agenți bivalenți. Bivalența anticorpului face posibilă, în cazul în care numărul de determinanți antigenici per antigen este

[25] clona, reprezintă o populație celulară care derivă de la o singură celulă generatoare (genitoare)

egal sau mai mare de doi, reticularea antigenilor de către anticorpi[26]. În acest mod, se formează structuri voluminoase, cu mobilitate scăzută. Diferite tipuri de legări anticorp-antigen sunt prezentate în *Fig 3.47.*

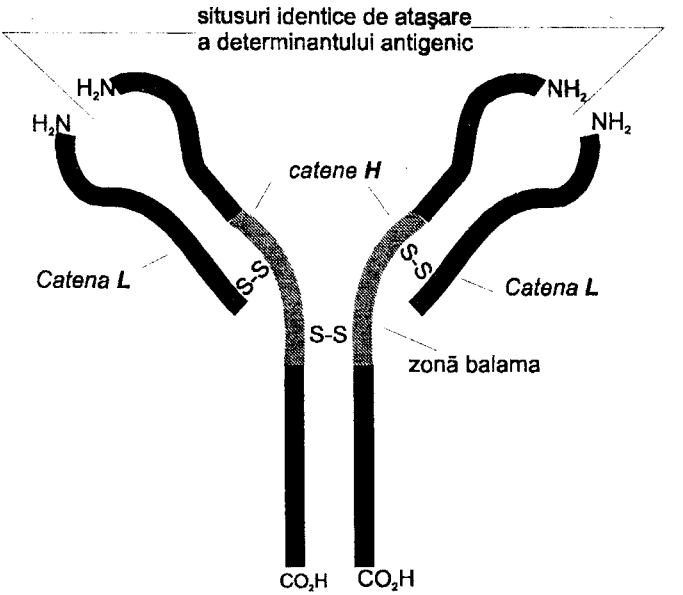


Fig. 3. 46. Structura de principiu a unității de bază a unui anticorp

Structura unității monomerice este formată dintr-o pereche de dimeri și are stoechiometria H_2L_2.

Catenele H, numite și catene grele (de la *H*eavy) au masa de cca 50 kD fiecare. Pe catenele H există o zonă, aproximativ la mijloc numită zonă **balama**.

Catenele L, (L de la *L*ight - ușor) sunt scurte și au masa de 25 kD fiecare. Deci masa globală a IgG este de cca 150 kD. Legarea celor patru catene se face prin intermediul punților disulfurice. Structura principială a ansamblului monomeric este prezentată în *Fig. 3.46.* Zona balama permite, prin mobilitata sa, ajustarea distanței dintre situsurile de legare ale determinanților antigenici astfel încât anticorpul să poată reticula determinanți antigenici prezenți la distanțe diferite pe suportul unic (*Fig.3.47.*).

În mamiferele superioare, există cinci clase de anticorpi (imunoglobuline), care se diferențiază în funcție de catena H, de numărul de punți

[26] numărul de determinanți antigenici de pe un antigen poară numele de **valența antigenului**.

disulfurice, precum și în funcție de conținutul de hidrați de carbon. Pe lângă aceste caracteristici chimice de diferențiere, cele cinci clase de anticorpi se particularizează prin proprietăți antigenice comune. Aceasta, pentru că anticorpii înșiși au proprietatea de a induce anticorpogeneza (sunt imunogeni), prin determinanții antigenici pe care îi poartă. Cele cinci clase de anticorpi sunt: **G, M, A, D** și **E** sau **IgG, IgM, IgA, IgD** și **IgE**, la care catenele H se numesc respectiv γ, μ, α, δ și ε. Toate aceste tipuri au structura de bază descrisă pentru IgG și prezentată în *Fig. 3.46.*

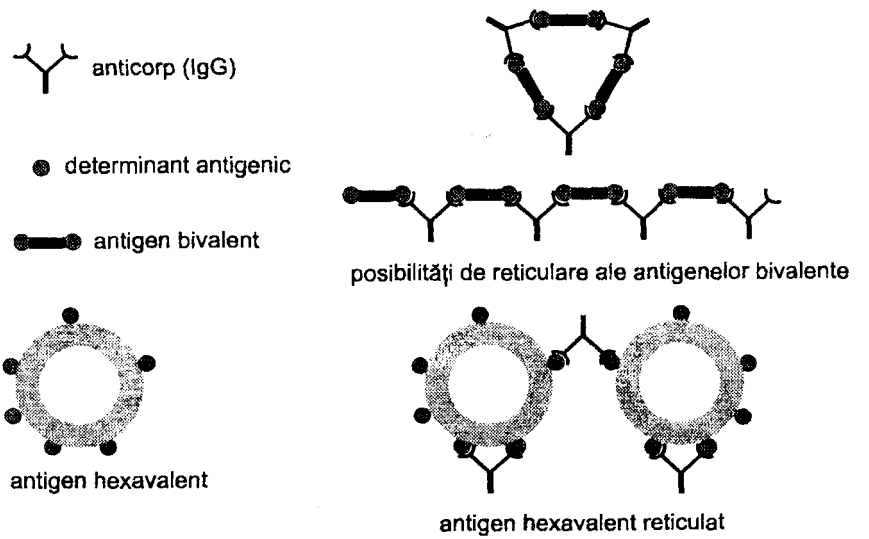


Fig. 3. 47. Modalități de legare a anticorpilor de antigeni bi- și multi- valenți

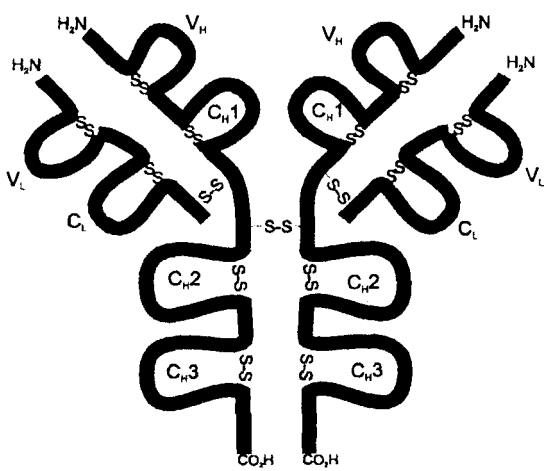


Fig. 3. 48. Zonele cu secvențe constante și variabile din structura unui anticorp

Comparând structura de bază a mai multor anticorpi, se constată că există domenii care individualizează fiecare anticorp. Acestea au *secvențe variabile* de aminoacizi și sunt situate la capetele N-terminale. Aceste zone sunt notate V_L și V_H în funcție de catenele pe care se găsesc: L, respectiv H. Aceste domenii sunt responsabile de legarea specifică a antigenilor. În aval de secvențele variabile se găsesc domenii cu *secvențe cu o constanță* remarcabilă intre diferiții anticorpi. Pe catena L se găsește un singur astfel de domeniu C_L, iar pe catena H se găsesc trei domenii constante: C_H1, C_H2 și C_H3. Toate domeniile, variabile și constante sunt delimitate prin legături disulfurice (*Fig. 3.48.*). Studiul sistematic al structurii anticorpilor se poate face prin procedee care clivează selectiv legături ce mențin structurile de tip terțiar și cuaternar. Comun utilizați sunt papaina, pepsina precum și diferiți reactivi de reducere ai punților disulfurice (*Fig.3.49*). **Papaina**, în urma unui tratament blând (scurt ca durată și cu concentrație mică de enzimă), clivează ambele catene H, înainte de puntea disulfurică dintre ele (în sens normal N → C). Prin aceasta se formează două fragmente identice **Fab**[27], care conțin situsul de legare al determinantului antigenic, și un fragment **Fc**. Acest ultim fragment, format din două porțiuni N-terminale ale catenei H este ușor cristalizabil de unde și codificarea **Fc**. Fragmentele **Fab** au capacitatea de legare a antigenului, dar nu pot realiza reticularea antigenilor polivalenți.

Pepsina, ca și papaina, rupe două legături peptidice opuse de pe catena H, dar după puntea disulfurică. Prin aceasta rezultă două fragmente: unul **F'(ab)$_2$** care conține cele două situsuri intacte de legare a antigenului și fragmentul **F'c**. Fragmentul **F'(ab)$_2$**, care este bifuncțional, va putea lega și în același timp reticula antigenii multivalenți.

Prin **reducere**, se pot obține cele două catene H și cele două catene L, cu grupările SH libere.

Cele 12 domenii (patru domenii variabile și opt domenii constante), au structură spațială asemănătoare, fiind formate din câte două foi beta. Domeniile constante sunt formate din 7 catene beta antiparalele: trei dintre ele grupate într-o foaie iar cele patru rămase, în altă foaie. Aceste două foi beta pot fi privite ca o topologie tip butoi în care se găsește motivul cheii grecești (vezi structuri suprasecundare).

---

[27] de la *a*ntigene *b*inding

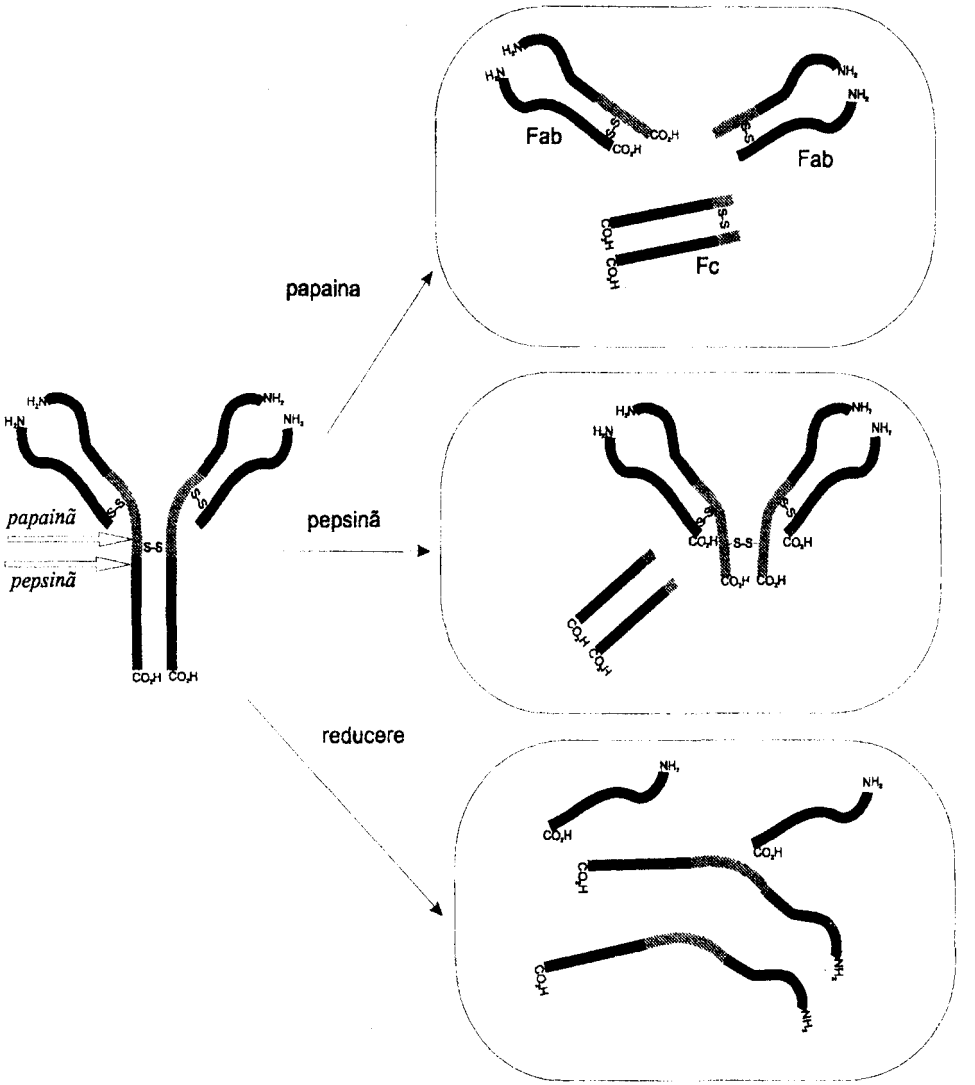


Fig. 3. 49. Studiul anticorpilor prin tratament cu papainã, pepsinã şi agent reducător

În *Fig 3.50.* se prezintă un model C_H întrutoul similar cu C_L (domeniile variabile au nouă catene beta vezi mai departe). Joncțiunea dintre catenele beta se face prin intermendiul unor zone scurte de buclă. Aceste structuri delimitează zone hidrofobe care pot interacționa cu cele similare din vecinătate precum și cu zone hidrofobe ale unor proteine cu care zonele constante vin în contact.

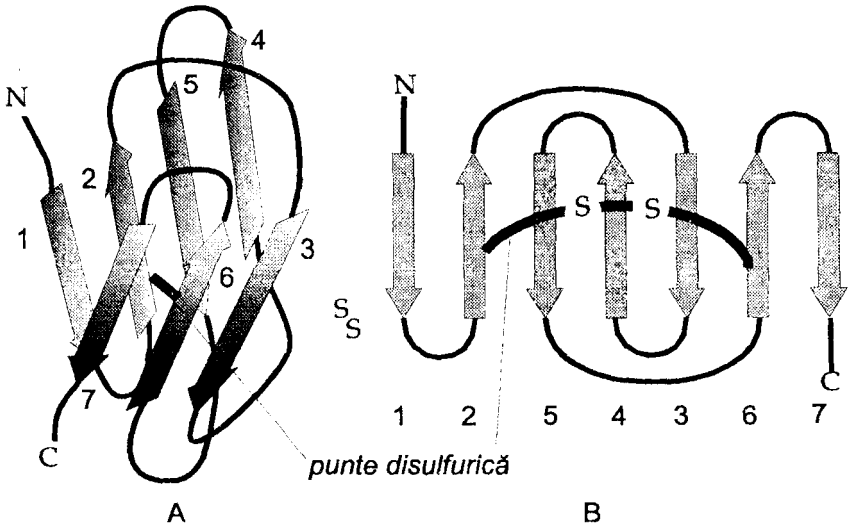


Fig. 3.50. Dispunerea catenei polipeptidice în domeniile constante din Ig

Domeniile constante sunt împerecheate: C_H1 cu C_L (din lanțurile L și H), respectiv C_H2: C_H2 și C_H3: C_H3 din lanțurile H perechi. Studiile de difracție de raze X au arătat că împerecherea se face la nivelul foilor tetracatenare (catenele 1, 2, 5 și 4 vezi *Fig. 3.50.*). prin interacțiuni de tip hidrofob.

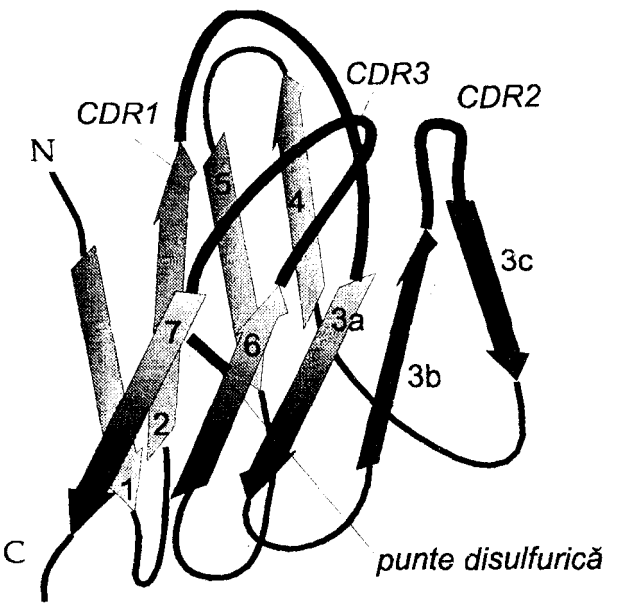


Fig. 3.51. Dispunerea catenelor beta (organizate în două foi) pentru domeniile variabile

Structura domeniilor variabile este asemănătoare cu structura domeniilor constante. Diferența constă în două catene beta antiparalele suplimentare, care se inseră în bucla care conectează catenele 3 și 4 din structura domeniilor constante (catenele 3 b și 3c *Fig. 3.51.*) Domeniile hipervariabile CDR1, 2 respectiv 3 sunt plasate în zonele de buclă. Pentru un domeniu, cele trei zone hipervariabile sunt dispuse foarte apropiat în spațiu, ele fiind responsabile de interacțiunea cu determinantul antigenic (epitopul). Mai mult, zonele hipervariablie de pe catena H și cele de pe catena L sunt plasate față în față. Joncțiunea dintre domeniile variabile se face la nivelul foilor tetracatenare, în acest mod buclele hipervariabile fiind dispuse apropiat în spațiu. Acest mod de asamblare va genera o structură de tip butoi, realizată cu ajutorul catenelor beta, iar buclele unde se găsesc zonele hipervariabile fiind plasate pe fața superioară a acestei construcții (aflate la capătul brațului anticorpului), delimitând un situs de legare, cu specificitate extrem de ridicată, conferită tocmai de zonele hipervariabile.

3.8.1.2. Tipuri de anticorpi

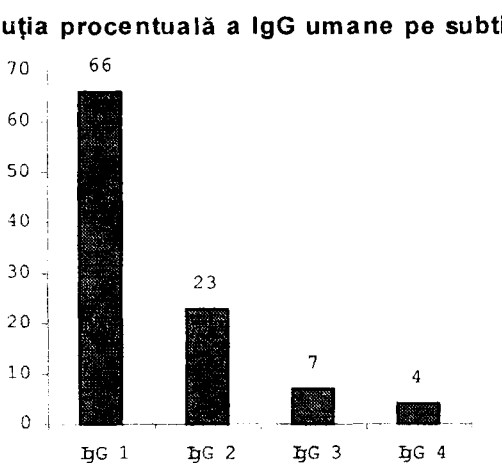


Fig. 3.52. Proporția tipurilor de IgG

IgG este cel mai răspândit tip reprezentând 70–90 % din totalul anticorpilor circulanți. În funcție de natura catenei γ, se disting patru subtipuri de IgG, respectiv IgG 1, IgG 2, IgG 3 și IgG 4. **IgG 1** (*Fig.3.52*) are două punți disulfurice spre capătul C-terminal al regiunii balama, **IgG 2** are patru punți disulfurice dispuse la ambele capete ale regiunii balama, **IgG 3** are 15 punți disulfurice de la balama până la C_H2, iar **IgG**

4 are două punți disulfurice dispuse la ambele capete ale regiunii balama. De notat că imunoglobulinele G sunt cei mai eficace agenți în apărarea antibacteriană. Ele sunt singurele care pot traversa bariera placentară, contribuind astfel la protecția fătului.

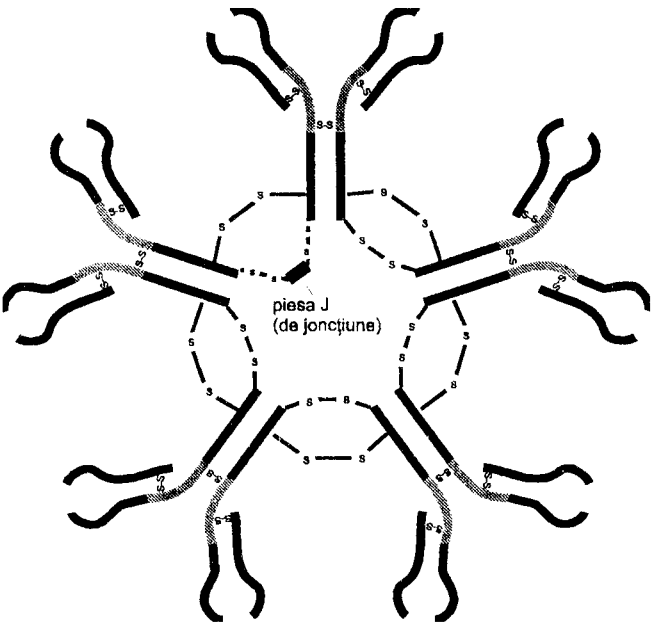


Fig. 3.53. Structura pentamerică a IgM

IgM este secretat ca pentamer al structurii monomerice de bază. Joncțiunea unităților monomere se face prin punți disulfurice precum și printr-o piesă specială numită J (de la englezescul joining). (*Fig.3.53.*).

Este primul anticorp secretat, ca răspuns la antigen. Celulele B imature, (pre-B), sintetizează mai întâi catenele grele ale acestui anticorp, μ, care se vor cupla cu catene ușoare impropriu numite catene-surogat. Pe măsură ce sinteza catenelor ușoare proprii are loc, acestea vor înlocui în structura monomerilor Ig catenele surogat, iar structura formată va fi inserată în membrana celulară, putându-și astfel îndeplini rolul de a recunoaște antigenul.

IgA sunt principalii anticorpi din secreții (salivă, lacrimi, lapte, precum și secrețiile respiratorii și intestinale). Apare ca dimer, joncțiunea dintre cele două structuri de bază făcându-se prin intermediul unei piese J similară structural și funcțional cu cea de la IgM. De asemenea la nivelul structurilor Fc se află o catenă polipeptidică, al cărei rol se pare că este acela de protecție antiproteolitică (*Fig. 3.7.4.*).

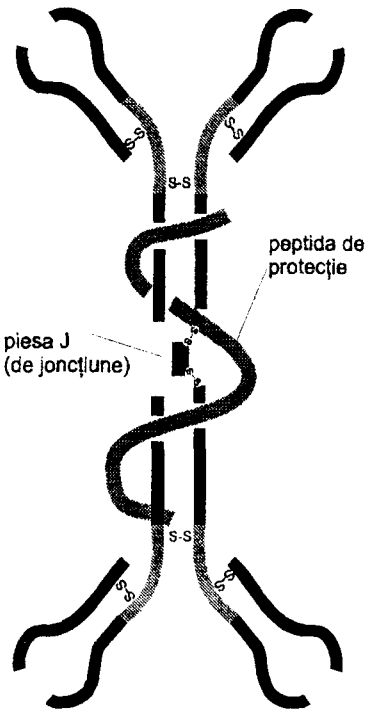


Fig. 3.54. Structura dimerică a IgA secretorie

Aceasta este cunoscută sub numele de **componentă secretorie** și are o masă de cca 60 kD. Pe lîngă tipul care este identificat în secreții IgA apare și în ser, unde o găsim fie sub formă monomerică fie di-, tri- și mai rar de tetramer. Plaja de concentrații a IgA serice este de 1–4 $g \cdot l^{-1}$., reprezentând 5–25 % din totalul anticorpilor serici.

IgE sunt formate din lanțuri grele mai lungi și spre deosebire de tipurile mai sus prezentate, nu traversează placenta. În condiții normale, concentrația acestei specii este redusă (0,5 $g \cdot l^{-1}$). La apariția unor infecții bacteriene, fungice sau virale, concentrația crește mult. Prin atașarea antigenului la IgE legată de celula receptoare[28] (mastocit sau bazofilă), aceasta, printr-un proces de exocitoză va expulza histamină. Această amină biogenă, provenită prin decarboxilarea histidinei, este responsabilă de manifestarea alergiilor. Efectul imediat este dilatarea și creșterea permeabilității vaselor sangvine. Acestea se pot asocia cu un tablou general care include febra, astmul, urticaria etc. Prin modificările vaselor sangvine, se facilitează accesul leucocitelor, al anti-

[28] IgE este secretată de celule de tip B, și se atașează de celule purtătoare specifice (bazofile mastocite), care prezintă pe suprafața lor receptori pentru porțiunea Fc.

corpilor și al altor elemente ale răspunsului imun (sistemul complement) la locul infecției.

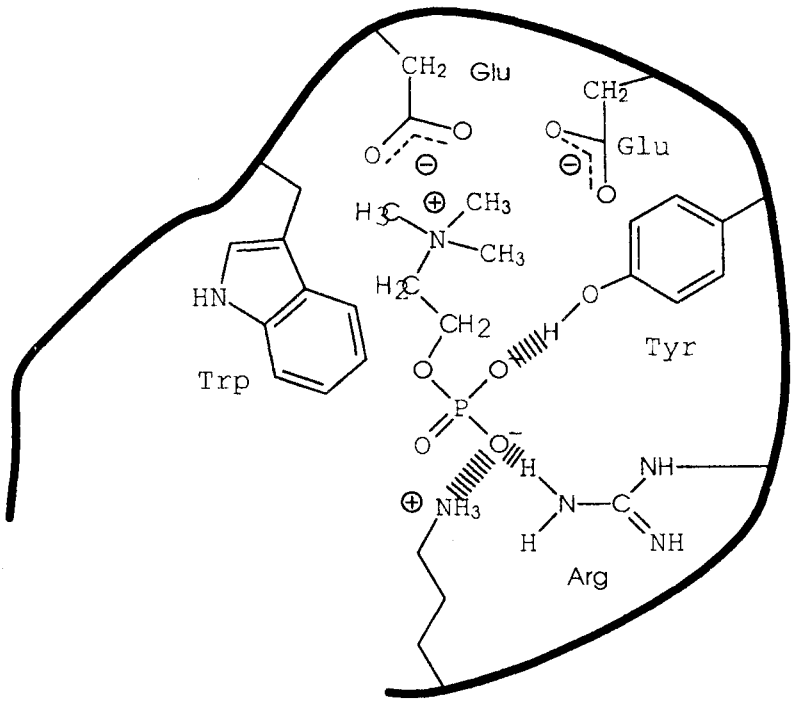


Fig. 3.55. Atașarea fosforilcolinei în interiorul unui anticorp specific, cu prezentarea de aminoacizi care asigură stabilizarea substanței.

IgD se găsesc în cantitate extrem de redusă (concentrația lor nu depășește 0,03 g · l^{-1}. De asemenea durata de viață este redusă comparativ cu celelalte tipuri de imunoglobuline la cca. 6 zile.

Modul concret de legare al haptenelor[29] și antigenelor a fost relevat prin analize de difracție de raze X.

Cazul concret al legării fosforil colinei este citat în literatură și exemplificat în *Fig. 3.55.*

Specificitatea cu care anticorpii atașează antigenii corespunzători a făcut din anticorpi instrumente de separare și analitice de un deosebit rafinament.

[29] O haptenă este o substanță care se poate atașa de un anticorp preexistent, dar care singură nu poate induce formarea de anticorpi (nu posedă imunogenitate). Pentru a putea induce anticorpogeneza, haptena trebuie conjugată (condensată) cu un fragment macromolecular, de regulă albumină serică bovină – vezi abzimele.

Cromatografia de afinitate realizată cu cupluri antigen anticorpi permite separări extrem de specifice aplicabile amestecurilor complexe.

Metodele imunologice de analiză sunt dintre cele mai sensibile metode cunoscute în prezent:

♦ Radioimunoanaliza (RIA) se bazează pe atașarea la un anticorp de titru (capacitate de legare) cunoscut a unei cantități dintr-un antigen de dozat iar ulterior a unei cantități radiometrabile dintr-un exces adăugat. Prin diferența dintre maximul radiometrabil și cantitatea radiometrată efectiv se poate estima cantitatea de dozat atașată inițial.

♦ Analiza prin legare imunoenzimatică, (ELISA – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) reprezintă o metodă imunoenzimatică prin care anticorpul substanței de dozat se atașează covalent de o enzimă, cel mai adesea peroxidaza. Complexul antigen - anticorp va avea o activitate enzimatică măsurabilă, corelată cu cantitatea de antigen atașată.

3.8.2. Mioglobina și hemoglobina

Trecerea de la viața anaerobă la cea aerobă a constituit un important salt înainte pe scara evolutivă deoarece randamentul energetic de utilizare al substratului glucidic crește de mai multe ori (18 ori în cazul glucozei).

Vertebratele și-au dezvoltat două sisteme care să asigure transportul și furnizarea de oxigen până la celula utilizatoare: o infrastructură constituită din sistemul circulator și un sistem de transport și stocare reprezentat prin hemoglobine și mioglobine. Cerințele majore la care trebuie să facă față sistemul de stocare și transport sunt (1) solubilitatea scăzută a oxigenului în apă și (2) variația relativ mică a presiunii parțiale a oxigenului între punctul de preluare și punctul de furnizare. Aceasta presupune o legare reversibilă a oxigenului, gradul de legare depinzând de presiunea parțială a oxigenului. Pentru activitatea de transport au fost dezvoltate hemoglobinele, iar pentru activitatea de stocare mioglobinele. Structura lor diferă puțin între speciile lumii vertebratelor unde se găsesc.

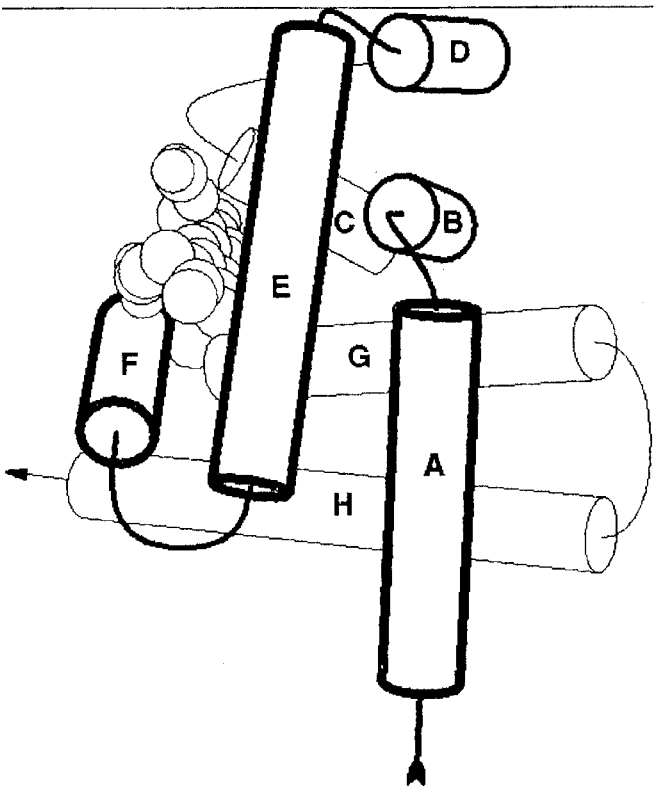


Fig. 3. 56. Dispunerea helixurilor şi a hemului în structura mioglobinei sau monomerului hemoglobinic

Mioglobina (Mb) este o cromoproteidă care are rolul de stocare a oxigenului în mușchi. Este foarte abundentă în corpul mamiferelor acvatice (balenă, cașalot, delfin). La celelalte mamifere, mioglobina are cel mai mare grad de acumulare în mușchii scheletici și în cei cardiaci. Culoarea roșie a mușchilor se datorează acestei substanțe.

Structura sa este construită pe o catenă polipeptidică *globina* formată din 153 aminoacizi. Aceștia se dispun pe opt α-helixuri notate cu litre A - H, dinspre capătul N-terminal către cel C-terminal (*Fig.3.56*). Fiecare aminoacid din helix se notează cu o cifră ce succede litera helixului. Această cifră specifică, în sensul N → C poziția aminoacidului în helix. (aminoacidul 4 din α-helixul C se codifică C4). Joncțiunea dintre helixuri se face prin intermediul unor porțiuni cu structură aleatorie codificate cu literele corespunzătoare helixurilor unite. La fel, aminoacizii din aceste zone se codifică prin numere de ordine (de exemplu CD3).

În interiorul catenei peptidice, într-un buzunar format din resturi de aminoacizi, în majoritate hidrofobe, se găseşte componenta neproteică, *hemul.*

Acesta este o feroprotoporfirină, cu aceeaşi structură la toate vertebratele.

Ea provine din protoporfirina IX (*Fig.3.57.*). În centrul structurii tetrapirolice se găseşte ionul de fer. Doar structurile feroporfirinice care conţin Fe^{2+} pot lega oxigenul. Aceste structuri sunt cunoscute sub numele de structuri *heminice,* spre deosebire de cele care conţin Fe^{3+}, numite *hematinice.*

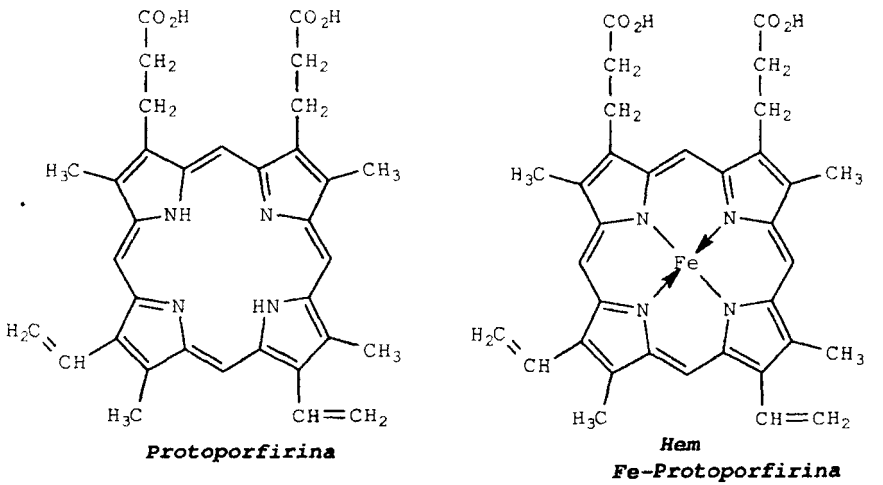


Fig. 3. 57. Protoporfirina IX şi Hemul, structuri din mio- şi hemoglobină

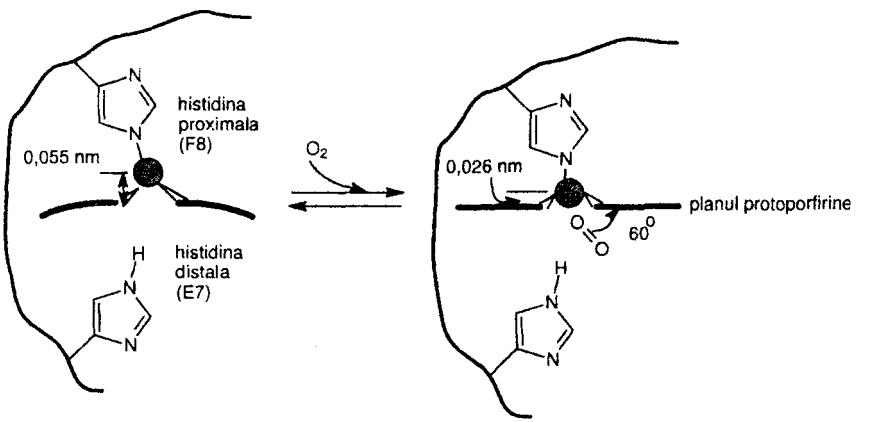


Fig. 3. 58. Dispunerea hemului între histidina proximală şi histidina distală

Structura spațială a hemului este plană. Fe^{2+} se stabilizează prin două covalențe și două coordinații realizate prin intermediul atomilor de azot pirolici. Ionul feros mai poate realiza încă două coordinații în afara planului hemului. Perpendicular pe planul porfirinic se găsesc două nuclee imidazolice ale unor resturi de histidină din globină. Una dintre aceste coordinații este stabilă, fiind realizată prin intermediul azotului unui rest histidinic. Acest rest, numit *histidina proximală*, **F8**, se găsește mai aproape de ciclul tetrapirolic. Cealaltă coordinație este influențată de un alt rest de histidină, *histidina distală*, **E7**, se găsește la o distanță mai mare decât F8 neputând realiza astfel cordinația, dar în același timp fiind plasată la o distanță suficient de mică de planul heminic pentru a permite o bună coordinare din partea unui alt component. De aceea a șasea coordinație, realizată cu oxigenul, monoxidul de carbon sau apa se va face cu o tărie diminuată (*Fig.3.58*). Legarea hemului de componenta proteică se face în afara legăturilor cu ferul și prin intermediul metililor respectiv vinililor atașați macrociclului tetrapirolic (legături hidrofobe). Structura de ansamblu a mioglobinei este prezentată în *Fig. 3.59.*

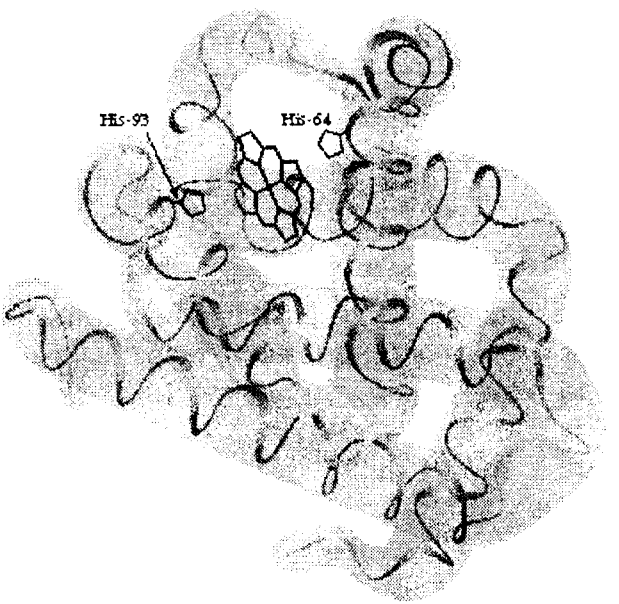


Fig. 3.59. Structura mioglobinei

Forma care conține oxigenul legat este **oximioglobina**. Legarea oxigenului este posibilă prin inserția acestuia între histidina distală și Fe^{2+}

și stabilirea unei coordinații. Zona de inserție este aglomerată, astfel încât molecula de oxigen nu va putea fi perpendiculară pe planul hemului, ci va face un unghi de aproximativ de 60°. Această deplasare nu va permite o legare puternică a oxigenului, care, astfel va putea fi eliberat mai ușor. În **deoximioglobină**, forma care ia naștere prin eliberarea oxigenului, locul acestuia poate fi luat de apă, care realizează coordinația ce stabilizează Fe^{2+}. Un inhibitor puternic al mioglobinei este monoxidul de carbon. Acesta are o afinitate mai mare față de mioglobină decât oxigenul. Raportul afinităților CO respectiv al O_2 față de inelul heminic crește de la 250 în mioglobină la $250 \cdot 10^3$ în hemul liber (de globină) în soluție apoasă. Aceasta dovedește odată in plus rolul pozitiv al aglomerării situsului de legare al oxigenului, care labilizează mai mult interacțiunea cu CO[30].

La concentrații mari, sau la timpi lungi de expunere la CO acesta își manifestă acțiunea toxică prin competiție la legare cu oxigenul, blocând o parte din mioglobină, după mecanismul descris mai sus.

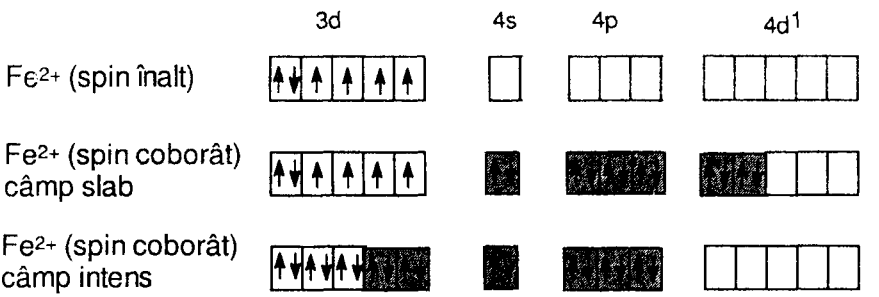


Fig. 3. 60. Configurația electronică a Fe^{2+} în hem. Explicații în text.

Legarea oxigenului mai are o consecință conformațională: În deoximioglobină, *Fe^{2+} pentacoordinat* (fără participarea apei), *este deplasat ușor in afara nucleului protoporfirinic spre histidina proximală.* Deplasarea de cca. 0,55 Å, este datorată neechilibrării vectoriale a forțelor care leagă ferul, repulsiei dintre electronii π ai inelului porfirinic și electronii Fe^{2+}, repulsiei dintre atomii de azot porfirinici și azotul histidinei proximale F8. În plus, datorită volumului mai mare al ionului feros de spin înalt aflat într-un câmp de liganzi relativ slab, nu încape în interiorul porfirinei. În *Fig.3.60.* se prezintă configurația electronică a

[30] De altfel CO este produs în urme prin metabolism. O legare prea puternică a acestuia ar bloca în timp mioglobina. Chiar în absența CO, lipsa împiedicării sterice ar mări afinitatea pentru oxigen, îngreunând eliberarea acestuia la nevoie.

ionului Fe^{2+}, necoordinat și în stare hexacoordinată în câmpuri de liganzi intensitate diferită. Orbitalii hașurați sunt ocupați de electroni de coordinație. Deplasarea ferului în afara planului nucleului porfirinic antrenează deformarea acestui plan.

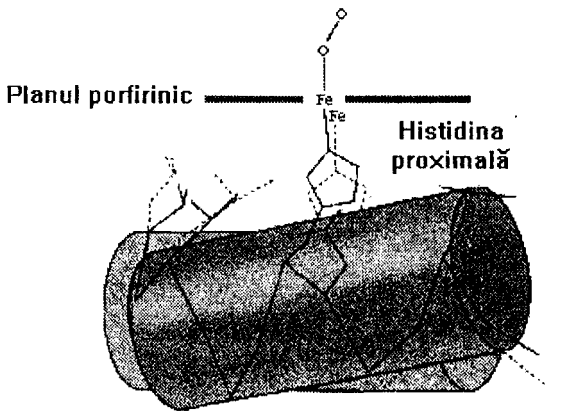


Fig. 3.61. Deplasarea prin oxigenarea hemului a helixului atașat de histidina proximală

Prin legarea moleculei de oxigen, datorită echilibrării electrice parțiale precum și reducerii volumului ionului de fer, acesta este atras către inelul protoporfirinic, (totuși rămâne o distanță între centrul nucleului și centrul atomului de Fe (0,26 Å); și aceasta este datorată asimetriei forțelor de legare a Fe din afara inelului porfirinic. Această modificare conformațională, la nucleul heminic, se transmite și la globină prin deplasarea odată cu ferul heminic a histidinei proximale, și a helixului F8, care la rândul lui modifică întreaga structură (*Fig.3.61.*) Importanța acestui fapt este neglijabilă la mioglobină, dar este crucială la hemoglobine.

Hemoglobinele (Hb) sunt substanțe care reprezintă cca. 90 % din masa uscată eritrocitară. Ele au rolul de a transporta oxigenul de la plămân până la celulele în care acesta este folosit în procesele oxidative. Transportul se face prin forma de oxihemoglobină (HbO_2).

Ele realizează transportul oxigenului prin echilibrele:

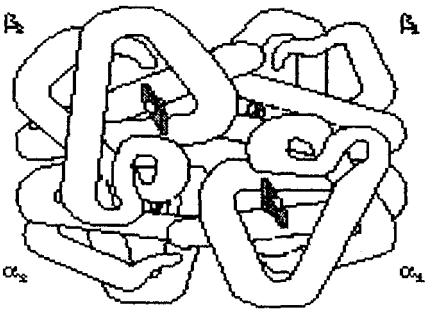


Fig. 3. 62. Tetramerul hemoglobinic

Estimarea capacității de transport a oxigenului de către hemoglobina din sânge se face prin intermediul unui parametru, **puterea oxiforetică** (Pox). Aceasta este definită ca volumul de oxigen legat de hemoglobina existentă în 100 ml de sânge. La adultul sănătos valoarea acestui parametru este 19,6 ml oxigen.

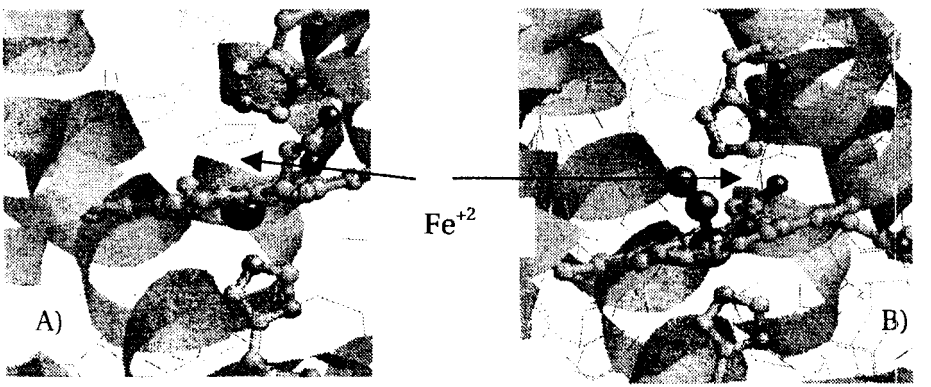


Fig. 3. 63. Modelul deoxi- şi oxihemoglobinei

Abaterile de la valoarea normală pot avea semnificație patologică. Sistemul circulator poartă oxihemoglobina de la alveolele pulmonare la țesuturile unde este nevoie de oxigen prin intermediul sângelui arterial. Sângele care conține hemoglobina fără oxigen, se reîntoarce la plămâni sub formă de sânge venos. Sângele venos este mai închis la culoare decât cel arterial. Aceasta modificare se datorează deplasării maximelor de absorbție în vizibil ale hemoglobinei, ca urmare a deoxigenării (oxigenării). Astfel Hb are un maxim la 560 nm, iar HbO_2 are două maxime: la 540, respectiv la 580 nm.

Hemoglobinele sunt substanțe cristalizabile. Forma cristalelor, permite identificarea sursei de proveniență, aspect de utilitate în criminalistică *Tab.3.7.*:

Tab.3.7. Sisteme de cristalizare pentru hemoglobine din diferite surse

Sursa de Hb	Sistem de cristalizare
Om	Ortorombic bipiramidal
Câine	Ortorombic
Cobai	Tetraedric
Cal	Monoclinic

Hemoglobinele au structură cuaternară, tetramerică (*Fig.3.62.*), fiind formate din două tipuri de catene polipeptidice, din șase structuri posibile (α,β,γ,δ,ε și ζ). În cazul omului adult hemoglobina A (HbA) posedă catene de tip α și β: Hbα- cu 141 de aminoacizi și Hbβ- cu 146 de aminoacizi. Fiecare din acestea conțin aceeași componentă neproteică, hemul.

Atașarea moleculei de oxigen pe fiecare dintre cei patru protomeri se face similar cu atașarea oxigenului pe mioglobină. Procesul este prezentat în *Fig.3.63.* pentru catena α. În *Fig.3.63.* A) în structura deoxi- se observă ionul Fe^{2+} care iese din planul curbat al hemului apropiindu-se de histidina proximală (His 87). În *Fig. 3.63.* B) se observă cu atașarea angulară a oxigenului antrenează deplasarea Fe^{2+} în interiorul ciclului porfirinic.

Cei patru protomeri se dispun în două subunități identice αβ, formând structura globală $\alpha_2^A \beta_2^A$. Tot la adult se mai întâlnește o hemoglobină secundară HbA_2. Aceasta are stoechiometria $\alpha_2^A \delta_2^A$, diferind prin catena δ care înlocuiește catena de tip β. La embrioni și fetuși se întâlnesc catene de tip ζ (zeta), care înlocuiește catena de tip α, de asemenea catene ε și γ similare lui β.

În funcție de pH structura cuaternară $\alpha_2^A \beta_2^A$ poate disocia simetric sau asimetric în dimeri:

$\alpha_2^A \beta_2^A \rightarrow 2\alpha^A\beta^A$ (simetric în două subunități identice)

$\alpha_2^A \beta_2^A \rightarrow \alpha_2^A + \beta_2^A$ (asimetric în două subunități diferite)

Fiecare din cele două tipuri de protomeri care participă la structura unei hemoglobine, au o structură similară globinei din mioglobină (opt segmente α-helicoidale A - H). Structura prezintă doar similarități spațiale, existând mari diferențe între structurile primare (secvențele acestor catene). Cu toate aceste diferențe există aminoacizi conservați

(care pot fi găsiți la toate tipurile de hemoglobină indiferent de sursă). Aceștia sunt redați în *Tab.3.8.*

Tab. 3.8. aminoacizi conservați în diferite hemoglobine

Poziția	Aminoacid	Rol
F8	Histidina	Histidina proximală care leagă ferul heminic
E7	Histidina	Histidina distală a ferului heminic
CD1	Fenilalanina	Contact cu hemul (hidrofob)
F4	Leucina	Contact cu hemul (hidrofob)
B6	Glicina	Permite apropierea helixurilor B şi E
C2	Prolina	În bucla terminală a helixului C
HC2	Tirozina	Suport donor de leg. de hidrogen cu segmentul FG
C4	Treonina	Necunoscut
H10	Lisina	Necunoscut

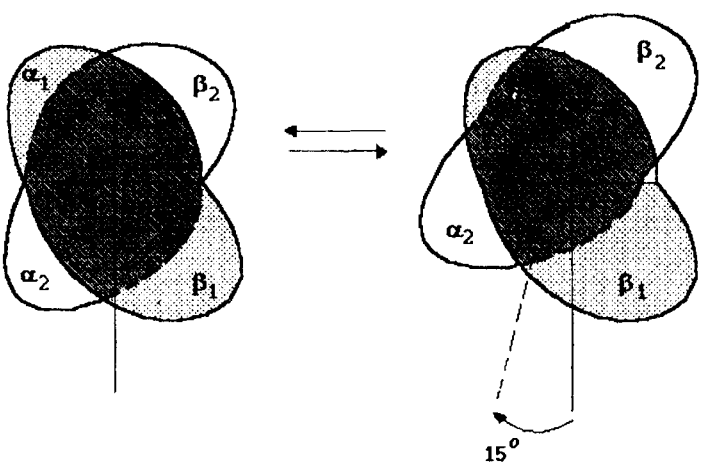


Fig. 3.64. Mişcarea relativă a heterodimerilor αβ prin oxigenarea/deoxigenarea hemoglobinei

Între catenele hemoglobinei[31] se manifestă o serie de interacțiuni. Interacțiunile cele mai puternice sunt realizate între subunitățile neidentice αβ și βα. Din acest motiv cele două unități heterodimerice identice au un mare grad de rigiditate. Ele se pot deplasa însă una față de cealaltă, în urma oxigenării – deoxigenării, printr-o mișcare de rotație cu cca. 15°, față de o axă ce trece printre cele două perechi αβ. (*Fig.3.64.*). Această mișcare de rotație este realizată printr-o basculare

[31] In continuare ne vom referi la hemoglobina de tip A. Celelalte tipuri de hemoglobină au comportament similar

conformațională care implică desfacerea unor legături ce stabilizează o stare și formarea unor legături care stabilizează noua stare. În acest proces sunt implicate legături de hidrogen și legături ionice.

Legăturile de hidrogen care se rup la oxigenare sunt stabilite între hidroxilul fenolic al penultimului aminoacid al fiecărei catene *tirozina* (Tyr α140, respectiv Tyr β 145, plasate în zona nehelicoidală care urmează helixului H adică Tyr α140 = Tyr HC2, respectiv Tyr β 145= HC2) și gruparea CO din catena principală care aparține unui rest de *valină* Val FG5 (pozițiile α93 și β98).

Legăturile ionice rupte prin oxigenare sunt în număr de opt. Șase dintre acestea sunt realizate între catene diferite. Dintre acestea, **două** sunt realizate între capetele N și C terminale ale catenelor α, **două** leagă capetele C terminale (carboxilații) ale subunităților β, de câte un rest de lisină Lys 40 din subunitățile α, și **două** leagă restul Arg141 dintr-o catenă α de restul Asp126 al celeilalte catene α. Legăturile ionice intracatenare care se rup la oxigenare leagă resturile Asp94 cu His146 din fiecare catenă β. (*Fig.3.65*).

În stare neoxigenată, capetele C-terminale ale celor patru subunități sunt legate, conformația corespunzătoare fiind numită T (de la tense - tensiontă). În oxihemoglobină, prin desfacerea celor opt legături se eliberează și capetele C-terminale astfel încât acestea dobândesc o mare libertate de rotație, din acest motiv conformația oxihemoglobinei fiind numită R (de la relaxed – relaxată).

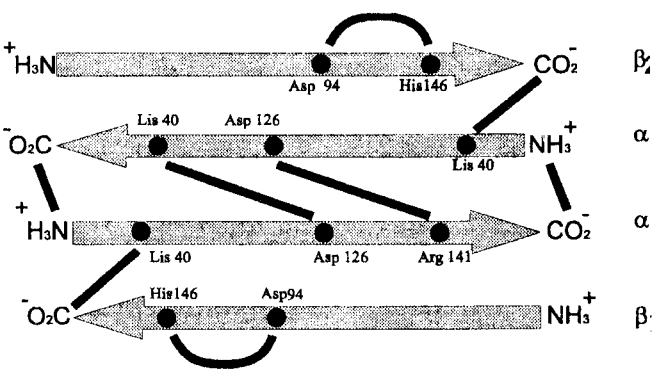


Fig. 3. 65. Legături ionice din hemoglobină afectate de oxigenare

Legarea oxigenului se face inițial la grupa heminică a catenei α, atunci când hemoglobina se găsește în stare T. În această stare structurile heminice ale catenelor β, sunt inaccesibile, datorită împiedicărilor sterice exercitate de resturile de aminoacizi ai helixului E. Și legarea

oxigenului la această subunitate este dificilă, din cauza celor opt tipuri de legături ionice și a celei de hidrogen mai sus amintite. Prin legarea oxigenului la subunitatea α, hemoglobina va trece în starea R, iar impedimentul steric dispare astfel devenind posibilă atașarea cu afinitate superioară a oxigenului și pe subunitățile β. Modificarea structurală cauzată de deplasarea histidinei proximale, implicit a helixului F, se transmite la protomerul adiacent, ceea ce îi mărește susceptibilitatea la legarea atomului de oxigen. Din acest motiv constantele de afinitate la legarea oxigenului diferă între subunități, odată cu legarea oxigenului. Succesiv, modificarea se transmite și celorlalți protomeri. Concret, afinitatea hemoglobinei pentru oxigen crește odată cu ocuparea succesivă a situsurilor de legare. Acest efect indică o cooperativitate a subunităților. De altfel diagramele de disociere ale mioglobinei și hemoglobinei pun în evidență acest efect. Diagrama de disociere este reprezentarea gradului de ocupare al situsurilor in funcție de presiunea parțială a oxigenului. Mioglobina neposedând structură cuaternară va prezenta o alură hiperbolică a curbei de disociere, în timp ce la hemoglobină va exista o formă sigmiodală (*Fig.3.67.*).

Studiind cantitativ asocierea - disocierea oxigenului putem scrie pentru **mioglobină**:

$$MbO_2 \rightleftharpoons Mb + O_2,.$$

de aici constanta de disociere:

$$K' = \frac{C_{Mb} \cdot C_{O_2}}{C_{MbO_2}} \qquad [3.1]$$

definind **gradul de saturare** Y ca raport al concentrației situsurilor ocupate la concentrația totală a situsurilor: $Y = \frac{C_{O_2}}{C_{O_2} + K'}$ [3.2]

Eliminând C_{MbO_2} din relația [3.2] și împărțind prin C_{Mb} se obține:

$$Y = \frac{C_{MbO_2}}{C_{MbO_2} + C_{Mb}} \qquad [3.3]$$

sau înlocuind C_{O_2} cu presiunea parțială a oxigenului p_{O_2} (p_{O_2} este proporțională cu C_{O_2} - în aceste condiții constanta de disociere se va exprima în torri, K), gradul de saturare va fi:

$$Y = \frac{p_{O_2}}{p_{O_2} + K} \qquad [3.4]$$

Evoluția gradului de saturare cu presiunea parțială a oxigenului are o alură hiperbolică (*Fig.3.66*)

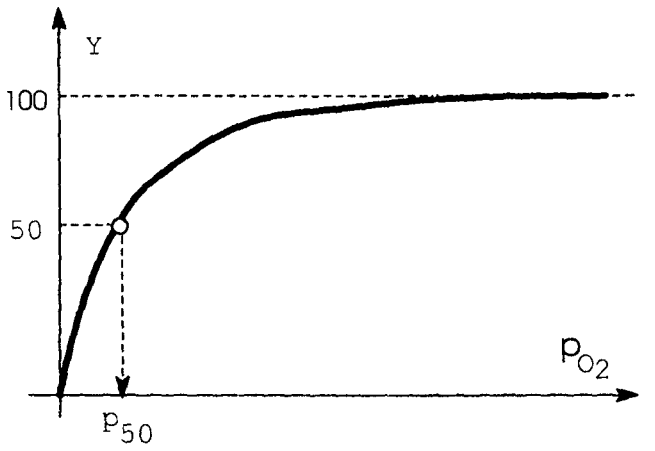


Fig. 3.66. Variația gradului de saturare al mioglobinei cu presiunea parțială a oxigenului

O mărime importantă este P_{50}, definită ca presiunea parțială pentru care gradul de saturare este de 50 %, adică:

$$0{,}5 = \frac{P_{50}}{P_{50} + K} \qquad [3.5]$$

rezolvând ecuația în P_{50} se ajunge la $P_{50} = K$.
Introducând această valoare în expresia [3.4], se obține:

$$Y = \frac{p_{O_2}}{p_{O_2} + P_{50}} \qquad [3.6]$$

prin transformare se obține:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{p_{O_2}}{P_{50}} \qquad [3.7]$$

Prin logaritmarea expresiei [3.7.] rezultă:

$$\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \lg(p_{O_2}) - \lg(P_{50}) \qquad 3.8]$$

În reprezentarea pe coordonatele $\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$, $\lg(p_{O_2})$ datele vor determina o dreaptă de pantă unitară.

În cazul **hemoglobinei**, care este un tetramer, considerăm echilibrul disociativ[32]:

$$Hb(O_2)_n \rightleftharpoons Hb + nO_2$$

De aici rezultă, pentru saturația Y o formă similară expresiei [3.6]:

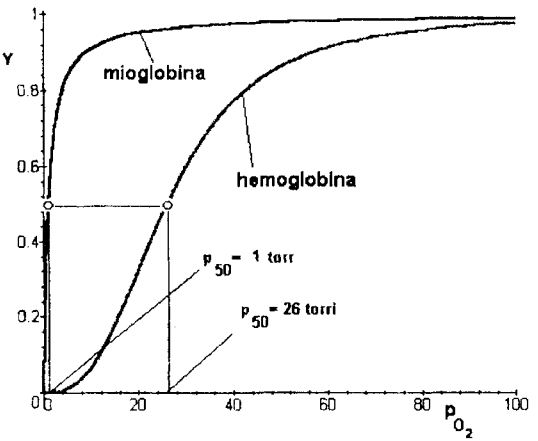


Fig. 3.67. Curbele de saturație ale hemoglobinei și mioglobinei

Reprezentarea curbei de saturație a hemoglobinei în funcție de presiunea parțială a oxigenului relevă alura sigmoidală a acestei variații comparativ cu a mioglobinei

$$Y = \frac{p_{O_2}^n}{p_{O_2}^n + K} \qquad [3.9]$$

Prin rearanjarea ecuației [3.9] se obține:

[32] Acest tip de echilibru presupune un mecanism de legare de tip „totul sau nimic" sau altfel spus un mecanism concertat. (Vezi reglarea activității enzimatice modelul MWC)

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{(p_{O_2})^n}{K} \qquad [3.10]$$

Prin logaritmare ecuația [3.10] devine:

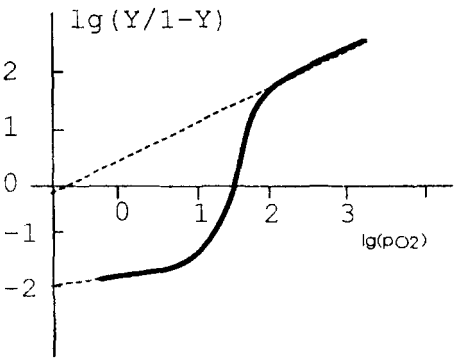


Fig. 3. 68. Reprezentarea ecuației [3.11] pentru hemoglobină

$$\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \cdot \lg(p_{O_2}) - \lg(K) \qquad [3.11]$$

La semisaturație, Y = 0,5, ceea ce duce la anularea expresiei [3.11]. De aici rezultă $K = (P_{50})^n$.

Prin reprezentarea pe întreg domeniul presiunilor parțiale a variației mărimii $\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$ nu se obține o dreaptă, cum ar fi de așteptat, ci o curbă sigmoidală (*Fig.3.68.*)

Porțiunea centrală din vecinătatea ordonatei nule poate fi asimilată cu o dreaptă. Panta acesteia reprezintă coeficientul n din ecuația [3.11] cunoscut sub numele de **coeficientul lui Hill**. Domeniul în care acesta ia valori indică existența sau inexistența cooperativității, respectiv intensitatea acestui proces. Un coeficient n=1 atestă lipsa cooperativității, cu alte cuvinte independența afinității legării unui ligand oarecare, în particular oxigenul, de legarea ligandului la alte situsuri din aceeași structură multimerică. Un coeficient supraunitar indică o cooperativitate pozitivă, adică o creștere a afinității de legare a ligandului prin atașarea prealabilă pe alt situs a ligandului respectiv, sau un n<1 atestă o cooperativitate negativă, adică o reducere a afinității legării prin legare prealabilă de alt situs.

Prelungind segmentele de dreaptă inițial și cel final până la intersecția cu ordonata, se obțin valorile –lg(K1) și –lg(K4), din care se pot deduce valorile constantelor de disociere corespunzătoare legării primei și ultimei molecule de oxigen pe tetramerul hemoglobinic. Inversul acestor mărimi este o măsură a afinității subunităților respective pentru oxigen.

Valoarea primei constante de disociere este mare (cca. 10^2), în timp ce K4 ≈ 1. Raportul afinităților pentru legarea ultimei și primei molecule de oxigen pe molecula de hemoglobină este așadar cca. 100.

Dacă nu ar exista interdependența sau cooperativitatea celor patru situsuri de legare a oxigenului din molecula hemoglobinei, eficiența transportului oxigenului de la sursă (alveolele pulmonare), la destinație (capilarele țesuturilor țintă) ar fi mai redusă. Un exemplu este edificator. Considerăm că:

Presiunea parțială în alveolele pulmonare este de 100 torri.

Presiunea parțială din țesuturile de eliberare a oxigenului este de 20 de torri.

În condițiile unui *coeficient de cooperativitate n=2,8* gradul de saturare alveolar este de Y_{alv}= 0,98, iar gradul de saturare în capilarele unde se eliberează oxigenul este de Y_{cap} = 0,32. Cantitatea de oxigen transportată de la plămân la țesuturi este proporțională cu diferența dintre cele două valori ale gradului de saturare $\Delta Y_c = 0.66$.

Pentru un *coeficient de cooperativitate unitar* (lipsa cooperativității) Y_{alv}= 0,79 iar Y_{cap} = 0,43, ceea ce conduce la $\Delta Y_n = 0.36$. Raportul ΔY_c / ΔY_n = 1,83 poate fi considerat o măsură a eficienței cooperativității în transportul oxigenului.

Factori suplimentari care afectează afinitatea hemoglobinei față de oxigen

Efectul Bohr

Afinitatea mioglobinei pentru oxigen este independentă de pH și CO_2 pe un domeniu larg. Spre deosebire de mioglobină, hemoglobina este sensibilă la variații de CO_2, implicit de pH, în domeniul fiziologic. Astfel, la creșterea concentrației de CO_2 respectiv la coborârea pH-ului, finitatea pentru O_2 scade, ceea ce provoacă o disociere a acestuia de pe hemoglobină[33].

[33] Concentrația CO_2 influențează pH-ul prin echilibrul $CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^{-2}$. Această reacție este catalizată de anhidraza carbonică.

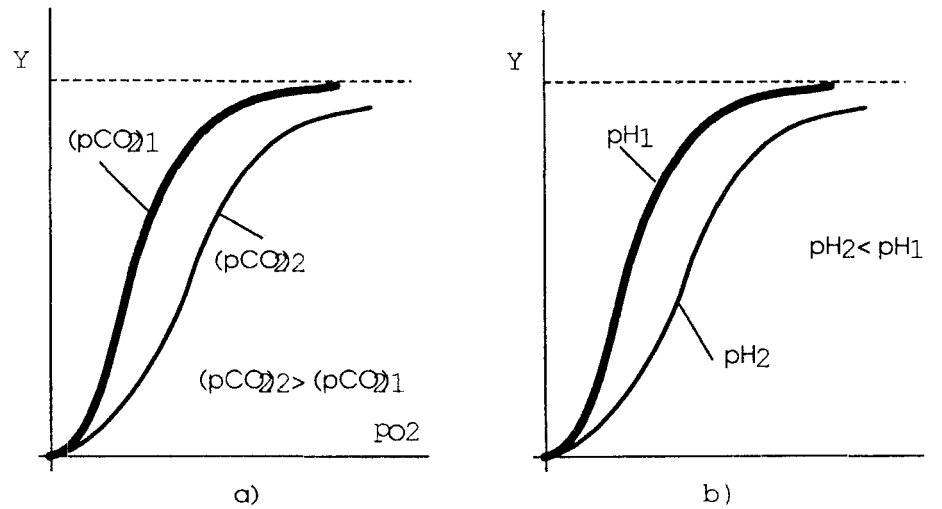


Fig. 3. 69. Influența concentrației de dioxid de carbon, respectiv a pH-ului asupra afinității atașării oxigenului de hemoglobină

Prezența abundentă a CO_2 este constatată în țesuturile cu activitate metabolică intensă, ca rezultat al proceselor oxidative exergonice. Nevoia de oxigen este firească, hemoglobina preia H^+ și CO_2 și eliberează O_2. Fenomenul a fost pus în evidență de **Christian BOHR**[34] în anul 1904. Fenomenul invers pus în evidență de **J.S. HALDANE**, are loc în plămân și constă în eliberarea H^+ și a CO_2 concomitent cu preluarea O_2, ca urmare a concentrației crescute a oxigenului. Legătura dintre O_2, H^+ și CO_2 este cunoscută sub numele de **efect BOHR.**

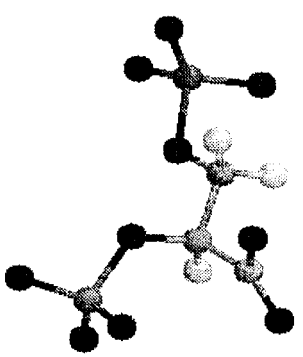


Fig. 3. 70. Modelul molecular al 2,3-difosfogliceratului (2,3-BPG)

În *Fig.3.69.* se prezintă dependența similară a afinității hemoglobinei de concentrația CO_2, respectiv de concentrația protonilor (pH).

Protonii nu sunt de fapt niște efectori alosterici (vezi alosteria la enzime), deoarece nu interacționează cu un situs specific din structura proteică. Ei vor protona resturile susceptibile, producând astfel modificări în numărul și structura legăturilor ionice și a celor de hidrogen. Există însă centre importante, care prin protonare afectează mult stabilitatea structurii hemoglobinei. Aceștia sunt aminoacizii N-terminali din catenele α, care în stare

[34] fiziolog danez, tatăl celebrului fizician Niels Bohr

protonată vor putea menține legătura ionică cu catenele α vecine (*Fig. 3.65.*). Similar, nucleele imidazolice ale histidinelor β146, prin protonare, vor putea menține legăturile ionice cu resturile Asp β94 din aceleași catene.

Dioxidul de carbon influențează afinitatea hemoglobinei față de oxigen nu numai prin dependența directă asupra pH-ului, ci și prin legarea chimică sub formă de carbamat: $R\text{-}NH_2 + CO_2 \rightarrow R\text{-}NH\text{-}COO^- + H^+$.

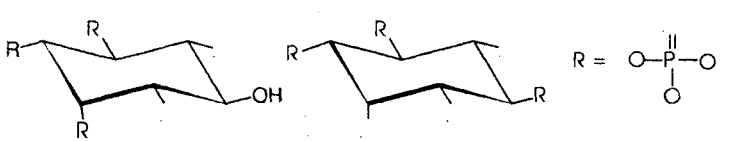
Echilibrul acestei reacții este deplasat spre dreapta odată cu creșterea presiunii parțiale a dioxidului de carbon. Prin formarea carbamatului, grupările amino, potențial cationice devin anionice. Reacția este particular importantă pentru capetele N-terminale ale catenelor α, care pot stabili legături ionice cu resturile cationice Argα141.

Spre deosebire de H^+ și CO_2, **2,3-difosfogliceratul (2,3-BPG)** (*Fig.3.70.*) este un efector alosteric autentic, prin selectivitatea legării sale. Observația lui Joseph BARCROFT că afinitatea pentru oxigen a hemoglobinei în soluție apoasă (p_{50} = 1 torr) este de cca. 26 de ori mai mare decât în eritrocit (p_{50} = 26 torri), a fost explicată în 1967 de Reinhold și Ruth BENESCH, pe baza rolului jucat de 2,3-BPG.

În *Tab.3.9.* Se reprezintă concentrațiile eritrocitare normale pentru substanțele intermediare ale glicolizei.

Tab.3.9. Concentrațiile eritrocitare normale ale unor intermediari glicolitici

Component	μM
Glucoză	5000
Glucozo- 6- P	83
Fructozo- 6- P	14
Fructozo- 1,6- P	31
Dihydroxiaceton- P	138
Glicerinaldehid- 3- P	19
1,3 -bisfosfoglicerat	1
2,3 - bisfosfoglicerat	4000
3 - fosfoglicerat	118
2 - fosfoglicerat	30
Fosfoenolpiruvat	23
Piruvat	51
Lactat	2900



Inositol pentafosfat (IPP) *Inositol hexafosfat (IHP)*

Concentrațiile eritrocitare ale 2,3-BPG și ale hemoglobinei sunt egale (aproximativ 4–4,5 mM). Structura 2,3-BPG conține cca. patru sarcini negative la pH-ul fiziologic. Acest ion se inseră între cele două catene beta, ale formei deoxi, unde va fi legat de sarcinile pozitive ale formelor protonate din His2, Lys82 și His143. Prin legarea ionică a 2,3-BPG, se stabilizează forma deoxi, care va avea deci o afinitate redusă față de oxigen. În urma oxigenării, cavitatea dintre cele două subunități β1și β2 devine mai mică și prin urmare, 2,3-BPG va fi expulzat.

La alte specii rolul 2,3-BPG poate fi jucat de substanțe diferite, dar care posedă de asemenea sarcini negative, provenite cel mai ades din resturi fosfat. La pești ca substanță reglatoare acționează ATP sau GTP. La reptile și păsări se întâlnesc derivați fosforilați ai mioinositolului: inositolpentafosfatul (IPP) și inositol hexafosfatul (IHP).

3.9. Proteine membranare

Cu toate că structura fundamentală a membranelor este dată de stratul dublu lipidic, diversitatea funcțională a membranelor celulare este în ultimă instanță datorată proteinelor membranare. Proteinele membranare asigură:

- legătura dintre citoschelet și matrixul extracelular,
- legătura dintre celule de același tip din cadrul unui țesut,
- transportul moleculelor și ionilor din interiorul formațiunii delimitate de membrană, în exterior,
- recepția semnalelor chimice din exteriorul celulei și-sau organitei celulare,
- cataliza enzimatică a unor reacții specifice, localizate membranar (ATP-aza și succinat dehidrogenaza din membrana mitocondrială internă) etc.

Odată cu evoluția organismelor, specializarea celulară duce la diversificarea funcțiilor membranelor, la apariția membranelor formațiunilor infracelulare. Dacă tipul de lipide rămâne aproximativ același în aceste membrane, factorul variabil se referă atât la raportul proteină - lipide, cât mai ales la diversitatea tipurilor de proteine întâlnite.

În medie, raportul masic proteină: lipide pentru o membrană plasmatică este cca. 1: 1. Acest raport suferă variații de la 1: 3 la celulele mielinice la 3: 1 la membranele interne ale mitocondriilor.

Trebuie menționat că pe lângă componentele lipidice și proteice, membranele mai conțin și componente glucidice atașate fie de proteine

(glicoproteine) fie de lipide (glicolipide), care contribuie de asemenea la rafinarea selectivității membranei, cele trei clase fundamentale de substanțe bioactive integrându-se funcțional la nivelul membranelor. Catenele oligoglucidice atașate fie de proteinele sau lipidele membranare, formează un înveliș celular, hidrofil, numit **glicocalix**.

3.9.1. Modalități de interacțiune a proteinelor cu straturile dublu lipidice

Multe dintre proteine sunt *integral membranare, (intrinseci)*, adică străbat membrana, apărând ca structuri bicefale, cu regiuni de ambele părți ale stratului dublu lipidic. Spre deosebire de proteinele solubile, proteinele integral membranare trebuie să posede zone hidrofobe la contactul cu catenele hidrofobe ale componentelor lipidice. În interiorul proteinei care străbate membrana pot exista și zone foarte hidrofile chiar canale. Termenul de **porină** este conferit proteinelor membranare intrinseci care posedă astfel de canale prin care pot trece molecule hidrofile sau ioni. Zonele aflate în interiorul membranelor se pot identifica din diagrama de hidrofobicitate (vezi lipofilicitatea proteinelor). Porțiunile proteice transmembranare sunt de regulă α-helixuri. Traversarea zonei puternic hidrofobe a duplexului membranar obligă legăturile peptidice, hidrofile, să stabilească între ele un număr maxim de legături de hidrogen. Ori, aceasta se realizează cel mai bine prin intermediul structurilor de tip helix.

Porțiunile externe ale proteinelor membranare pot fi identificate pe mai multe căi. Prima dintre ele este iodurarea nucleelor tirozinice cu peroxidază în prezența iodurii de sodiu și a apei oxigenate; o altă posibilitate ar fi utilizarea enzimelor proteolitice. În fine, porțiunile externe ale proteinelor se mai pot identifica prin utilizarea unor anticorpi specifici, eventual marcați[35]. Pe o catenă proteică se pot identifica unul (*Fig.3.71.A*) sau mai multe helixuri transmembranare (*Fig.3.71 B*). Porțiunile din catena peptidică aflate fie în citosol, fie în spațiul extracitosolic, conțin resturi hidrofile de aminoacizi. În cazul existenței mai multor porțiuni de α-helix pentru o anume proteină, acestea se plasează sub forma unor mănunchiuri, expunând către carbocatenele lipidelor, resturi hidrofobe (spre exterior), iar către interior, catena poate expune atât zone hidrofobe cât și hidrofile, dependent de gradul de stabilitate cerut, deoarece interacțiunile de tip legătură de hidrogen

[35] Marcare fluorescentă

sau dipol-dipol sunt mai puternice decât cele hidrofobe. Trebuie menționat că helixurile membranare au o funcționalitate complexă care presupune interacțiuni cu alte specii (ioni sau molecule) Ori aceste interacțiuni sunt dependente de natura aminoacizilor de contact. Extracția proteinelor intrinseci în vederea studierii lor, se poate face doar prin distrugerea integrității duplexului lipidic prin utilizarea detergenților. Uneori, interacțiunile hidrofobe proteină: lipide, în cazul proteinelor intrinseci sunt amplificate *prin atașarea covalentă de* catene acil (hidrofobe) la nivelul grupărilor NH_2, SH sau OH din resturile aminoacil ale proteinei. Catenele hidrofobe astfel atașate vor fi inserate în interiorul duplexului lipidic.

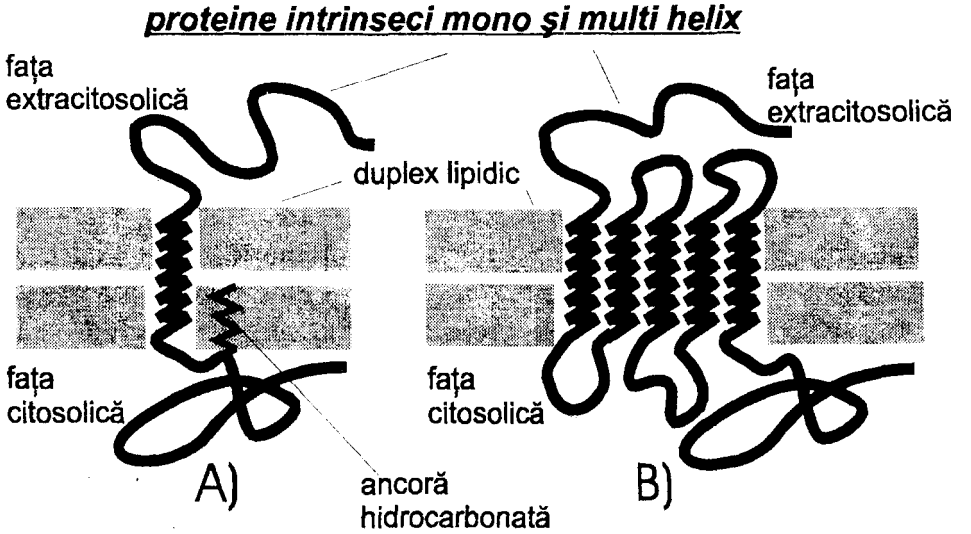


Fig. 3. 71. Proteine membranare intrinseci

Un aspect important legat de proteinele intrinseci este acela legat de punțile disulfurice. Acestea se pot stabili de regulă doar în spațiul extracitosolic, citosolul constituind un mediu prea reducător pentru existența punților disulfurice. Tot în spațiul extracitosolic se găsesc atașate și oligoglucidele.

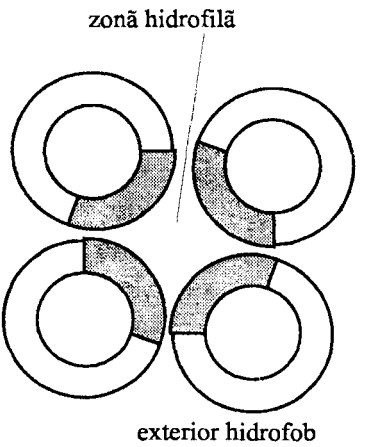


Fig. 3.72. Mănunchi de patru helixuri transmembranare care îşi expun spre exterior zone hidrofobe

Alte proteine sunt plasate spre sau la exteriorul stratului dublu lipidic. Ele se numesc *proteine periferice sau extrinseci.* Separarea acestora se poate face pur si simplu printr-un tratament cu soluţii saline diluate.

Proteinele periferice (fie citosolice fie extracitosolice) pot fi atașate de membrană prin intermediul unor alte proteine intrinseci, cu care stabilesc interacţiuni necovalente (*Fig. 3.73 A* şi B), sau pot fi atașate de membrană prin intermediul ancore hidrocarbonate. Ancora hidrocarbonată (formată din resturi acil sau farnesil *Fig. 3.74.*) se leagă covalent de proteina periferică.

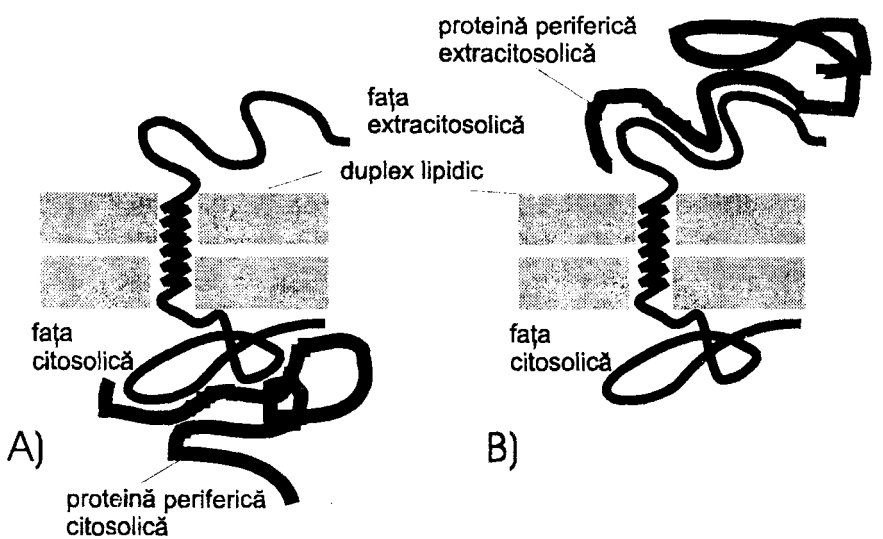


Fig. 3. 73. Ataşarea necovalentă a proteinelor periferice de membrană

Legarea covalentă de ancore pentru atașarea proteinelor de membrane.

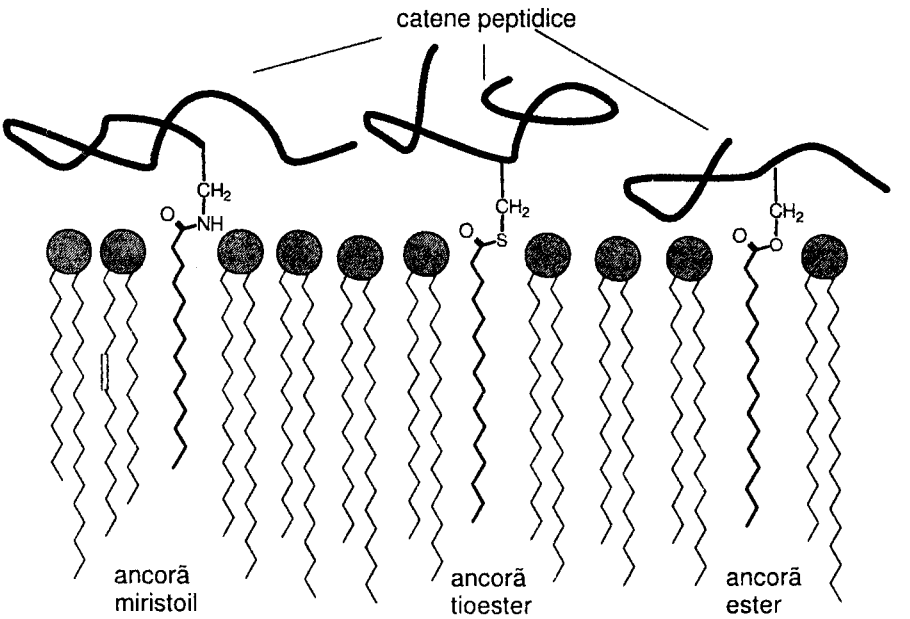


Fig. 3.74. Trei tipuri de ancore rezultate prin acilarea resturilor de aminoacizi

Legătura dintre componenta proteică și lipidele membranare poate fi întărită prin atașarea covalentă a unor catene care pot intreracționa suplimentar cu membranele. Aceste catene poartă numele de ancore, și sunt de cele mai multe ori resturi acil gras. Detectarea lor se poate face prin experimente „in vivo", cultivând celule pe medii ce conțin acizi grași tritiați, urmând ca după separarea proteinelor și conjugatelor acestora, catenele peptidice ce conțin ancorele marcate să se identifice pe placa de electroforeză.

1. *Ancora miristoil.* Un motiv des întâlnit este atașarea covalentă a unui rest **miristoil (C14)**, la nivelul aminoacidului N-terminal al componentei proteice. Acest aminoacid este în majoritatea cazurilor **glicocolul**. Legarea se face printr-o legătură amidică, fiind catalizată de o miristoil-CoA: protein *N-m*iristoil *t*ransferază (NMT [36]). Joncțiunea glicocol - miristoril este extrem de puternică fiind ruptă doar de hidroliza acidă sau alcalină. De asemenea blochează degradarea EDMAN (prin blocarea capătului proteic N-terminal).

[36] acronimul denumirii engleze

Exemple de proteine ancorate prin miristoilare sunt *proteinkinaza cAMP dependentă, tirozinkinaza pp60^{src}, calcineurina* (o fosfatază specifică), subunitatea α a *proteinelor G.*

2. *Ancore de tip acid gras (tio)esterice*

Acizii grași de tipul acidului palmitic, stearic, oleic și mai rar miristic pot constitui ancore pentru proteine. Joncțiunea se face la o cisteină, eventual serină sau treonină, prin intermediul unei legături tiolesterice (cisteină) sau esterice (în celelalte cazuri). Aminoacidul care realizează joncțiunea nu este neapărat terminal. Legăturile tiolesterice pot fi rupte foarte ușor prin tratare cu hidroxilamină în mediu ușor bazic.

Exemple de proteine ancorate prin ancora (tiol)esterică sunt: receptorii cuplați cu proteine G, glicoproteinele de la suprafața unor virusuri etc.

3. *Ancore prenilice de tip tioeteric*

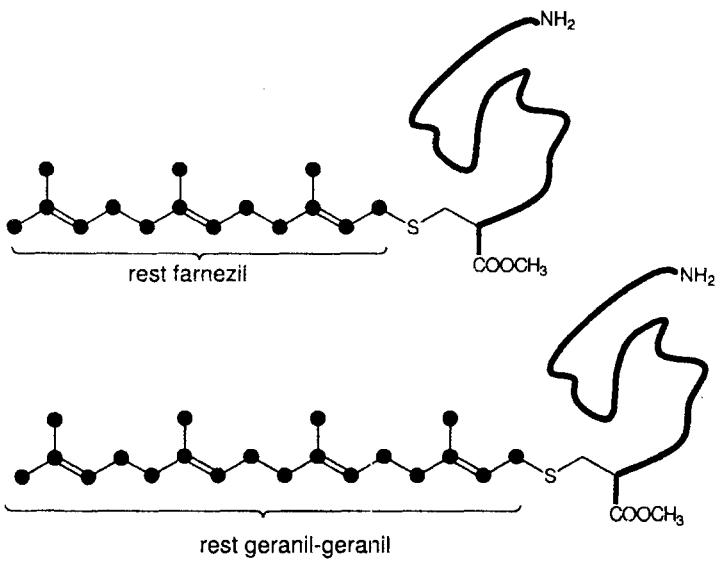


Fig. 3. 75. Ancore prenilice

Unitățile prenilice sunt formate din mai multe unități izoprenice, cel mai adesea trei (farnesil) sau patru (geranilgeraniol) *Fig.3.75.* Acestea se atașează de un rest de cisteină. Joncțiunea se realizează la capătul C terminal. Înainte de atașare ultimii aminoacizi sunt CAAX (C - cisteină, A - aminoacid alifatic, X - aminoacid oarecare). După realizarea legăturii tioeterice, la nivelul cisteinei, are loc excizia proteolitică a subunității AAX, astfel încât cisteina va deveni aminoacidul C-terminal. Procesul

este desăvârșit prin metilarea acestui carboxil. Prin aceasta are loc o mărire suplimentară a lipofilicității joncțiunii.

4. *Ancore fosfatidilinositolice.* Sunt motive de o complexitate ridicată. Catena polipeptidică este ancorată în stratul dublu lipidic printr-o structură de tip fostatidil inositolică (vezi lipide complexe). Joncțiunea dintre cele două componente se face prin intermediul unui motiv oligoglucidic. Exemplul tipic este al imunoglobulinei **Thy–1**, care aparține limfocitelor T (vezi anticorpi). Această proteină are dimensiuni mici (111 aminoacizi) și se pare că este implicată în interacțiuni de tip celulă - celulă.

Capătul C-terminal al acestei proteine se leagă amidic de un rest de 2-aminoetanolfosfat atașat la rândul său fosfoesteric de un rest manozil (*Fig.3.76.*).

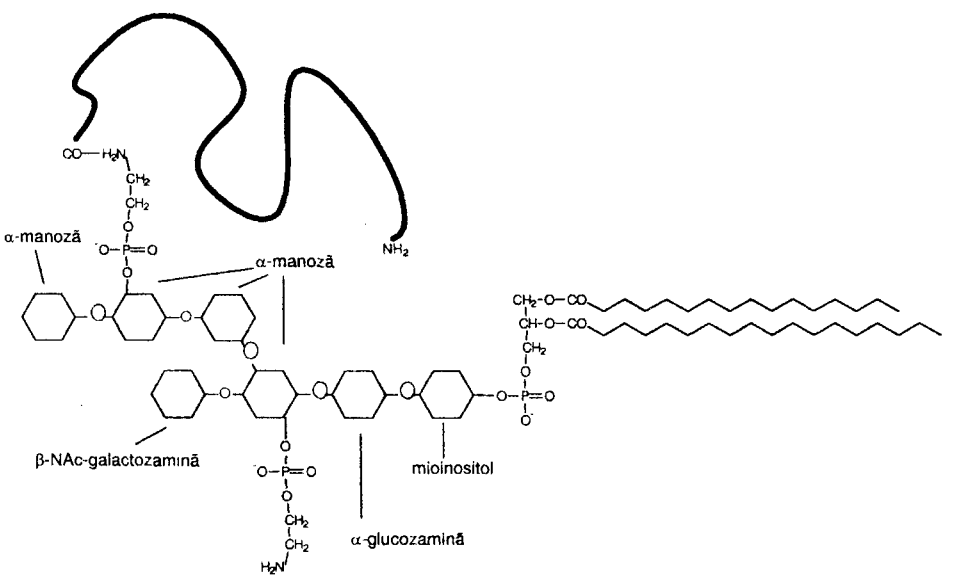


Fig. 3.76. Ancorajul proteinei Thy–1 prin intermediul fosfatidil inozitolului

3.9.2. Hidrofobicitatea catenelor polipeptidice

Acomodarea proteinelor cu mediul în care se găsesc presupune existența unei similarități hidrofob - hidrofile între proteină și vecinătatea sa. Deoarece proteinele citosolice sau cele din spațiile intercelulare se găsesc într-un mediu hidrofil, ele vor adopta conformații care să prezinte spre exterior resturile hidrofile ale aminoacizilor. Trebuie ținut de asemenea seama și de polaritatea legăturii peptidice, care poate

interacționa cu apa prin legături de hidrogen. Proteinele membranare, cele intrinseci în particular, vor adopta în mediul hidrofob structuri helicate. Aceasta, deoarece spre deosebire de mediul hidrofil, nu există competiția cu moleculele de apă la stabilirea legăturilor de hidrogen care stabilizează α-helixul. De aceea maximizarea numărului de legături de hidrogen se face exclusiv intracatenar. Ori structura helicată este o structură care permite stabilirea unei densități mari a legăturilor de hidrogen intracatenare. Nu orice helix poate traversa un mediu hidrofob. Aceasta depinde de natura hidrofilă sau hidrofobă a aminoacizilor care compun porțiunea respectivă de catenă.

Cuantificarea gradului de acomodare a α-helixului cu membranele (hidrofobe) sau cu mediile hidrofile se poate realiza cu ajutorul energiei libere de transfer din interiorul unei membrane, în apă. Aceasta mărime este caracteristică pentru fiecare rest de aminoacid (*Tab.3.10.*)

Tab.3.10. energiile libere de transfer mediu membranar – apă pentru aminoacizi

Rest de aminoacid	Energie liberă de transfer (kcal·mol^{-1})	Rest de aminoacid	Energie liberă de transfer (kcal·mol^{-1})
Fenilalanina	3,7	Serina	0,6
Metionina	3,4	Prolina	–0,2
Izoleucina	3,1	Tirozina	–0,7
Leucina	2,8	Histidina	–3,0
Valina	2,6	Glutamina	–4,1
Cisteina	2,0	Asparagina	–4,8
Triptofanul	1,9	Ac glutamic	–8,2
Alanina	1,6	Lisina	–8,8
Treonina	1,2	Ac aspartic	–9,2
Glicocolul	1,0	Arginina	–12,3

Deoarece grosimea medie a unui strat dublu lipidic este de cca. 30 ., rezultă că acesta poate fi traversat de un α-helix care conține 20 de resturi de aminoacizi. Se consideră că dacă o secvență de douăzeci de aminoacizi are o valoare (cumulată) a energiei de transfer superioară valorii de +20 kcal·mol^{-1}, segmentul respectiv poate penetra complet membrana citosolică sau organitică.

Evaluarea potențialului transbistrat al proteinelor se face cu ajutorul unor **diagrame de hidofobicitate**, în care se reprezintă cumulativ energia liberă de transfer membrană - apă. Modelul de relevare a unei astfel de diagrame este prezentat în *Fig.3.77.*

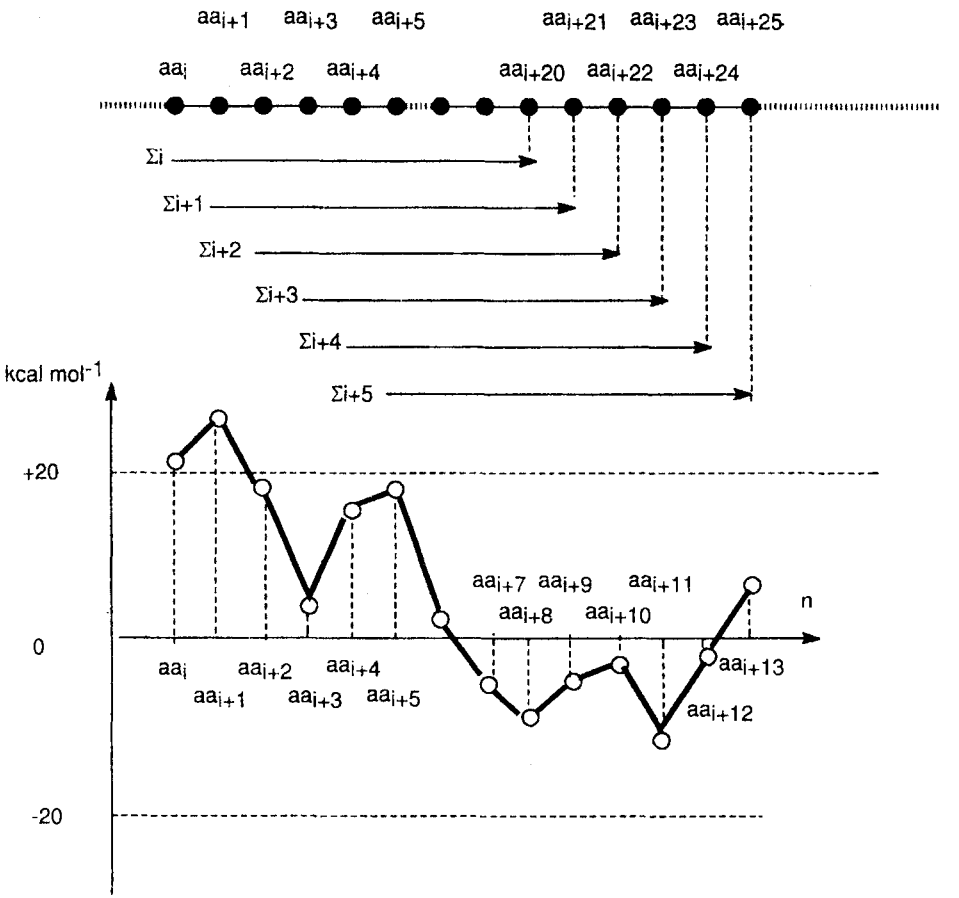


Fig. 3. 77. Modul de calcul al diagramei de hidrofobicitate (fereastra de lucru = 20 aminoacizi)

Plecându-se de la capătul N-terminal, se calculează suma energiilor libere de transfer pentru primii 20 aminoacizi din secvență. (Se poate lucra și cu altă dimensiune a „ferestrei", diferită de 20). Valoarea obținută reprezintă un prim punct în diagramă și se numește **indice de hidrofobicitate**. În continuare suma se face pentru cei douăzeci de aminoacizi începând cu al doilea aminoacid din capătul N-terminal. Astfel fiecare aminoacid din secvență va fi reprezentat cu suma corespunzătoare energiilor libere a douăzeci de aminoacizi care îi succed, inclusiv el. Aminoacizii care figurează în diagrama de hidrofobicitate cu valori superioare lui +20 kcal · mol^{-1}, pot fi considerați că pot începe o porțiune de α-helix care traversează o membrană. Pe lângă modalitatea cumulativă de calcul a indicelui de hidrofobicitate se utilizează și o variantă care mediază pe un segment de 19 sau 20 de aminoacizi valorile

individuale ale indicelui de hidrofobicitate. Pe lângă valoarea energiei libere de transfer se poate utiliza și alți indicatori empirici, determinați experimental (*Tab. 3.11*). Și în acest caz, modul de calcul al indicelui de hidrofobicitate este similar celui prezentat în *Fig. 3.77.*

Tab. 3.11. Valori ale scalei de hidrofobicitate, altele decât energiile libere de transfer mediu membranar – apă pentru aminoacizi, după[37] Doolittle(1*) și Engelman (2*)

Rest de aminoacid	1*	2*	Rest de aminoacid	1*	2*
Fenilalanina	2,8	3,7	Serina	–0,8	0,6
Metionina	1,9	3,4	Prolina	–1,6	–0,2
Izoleucina	4,5	3,1	Tirozina	–1,3	–0,7
Leucina	3,8	2,8	Histidina	–3,2	–3,0
Valina	4,2	2,6	Glutamina	–3,5	–4,1
Cisteina	2,5	2,0	Asparagina	–3,5	–4,8
Triptofanul	–0,9	1,9	Ac glutamic	–3,5	–8,2
Alanina	1,8	1,6	Lisina	–3,9	8,8
Treonina	–0,7	1,2	Ac aspartic	–3,5	–9,2
Glicocolul	–0,4	1,0	Arginina	–4,5	–12,3

În acest mod se pot evalua porțiunile transmembranare ale unei catene polipeptidice. Studiul poate fi completat cu determinarea fragmentelor nemembranare (deci cu hidrofobicitate scăzută) extracitosolice. Pentru aceasta există mai multe metode, fiecare dintre acestea bazându-se pe reactivi selectivi care reacționează cu porțiunile nemembranare ale catenelor. Problema pusă este relativ simplu de rezolvat cu segmentele extracitosolice, dar mai dificil cu cele intramembranare.

[37] Kyte, J.; Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982, 157: 105–132

Engelman, D.M., teity, T.A.; Goldman, A. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. Annu. Rev.Biophys.Chem. 1986:, 15, 321–353

CAPITOLUL 4. Enzime

Sunt substanțe polipeptidice cu funcție biocatalitică, sintetizate de către organismul viu. Întocmai ca și catalizatorii clasici din chimie, enzimele micșorează energia de activare a reacțiilor chimice, fără a modifica însă echilibrul reacțiilor reversibile. Enzimele fac posibile biotransformările substanțelor în condiții de neconceput pentru catalizatorii convenționali. Aceasta se datorează atât specificității și selectivității cât și activității enzimatice ridicate.

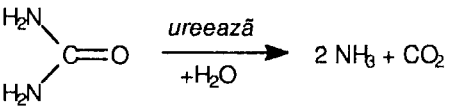
4.1. Specificitatea și selectivitatea enzimatică

Sunt însușiri necesare pentru acești biocatalizatori, care derivă în mod obiectiv din complexitatea mediului natural în care au loc reacțiile biochimice.

A. **Specificitatea** se poate sistematiza în:

- specificitate de substrat
- specificitate de reacție

A.I. **Specificitatea de substrat** se referă la preferința enzimei pentru o anumită specie moleculară (specificitate absolută) sau pentru un grup restrâns de specii cu structură similară (specificitate relativă la grup).



Specificitatea absolută implică interacția enzimei cu un singură substanță. Un exemplu tipic este *ureeaza*, o enzimă care acționează numai asupra ureei:

Specificitatea relativă de grup. Este caracteristică unor enzime care acționează asupra unei clase de compuși care posedă un element structural comun. Lipazele, enzimele proteolitice, fosfatazele sunt exemple clasice.

În cazul în care substratul reacției enzimatice posedă enantiomeri, preferința față de unul dintre aceștia, presupune *enantiospecificitate.* Este cazul enzimelor care acționează asupra aminoacizilor. Aminoacizii naturali fac parte din seria L. Enantiospecificitatea se manifestă prin

acțiunea doar asupra acestor aminoacizi[38]. Pe această acțiune se bazează utilizarea enzimelor în biotehnologii de scindare a unor amestecuri racemice. Similar există și *diastereospecificitate.*

A.II. **Specificitatea de reacție** desemnează doar o anume transformare a unui substrat din mai multe posibilități. Această acțiune, raportată la produsul de reacție în măsura în care este diferit în transformările suferite, poate fi exprimată și prin noțiunea sinonimă (în acest caz particular !) de **selectivitate**. Există cazuri în care specificitatea de reacție se manifestă doar asupra mecanismului de reacție, produșii obținuți fiind identici, doar căile biosintezei lor fiind diferite.

Aminoacizii, compuși bi- (multi-) funcționali pot suferi reacții biochimice care să afecteze diferit grupele funcționale, ceea ce duce la formarea unor compuși diferiți.

Astfel prin acțiunea unei oxidaze asupra unui aminoacid se obține un α-hidroxiacid, prin acțiunea unei decarboxilaze se obține o amină (biogenă) iar prin acțiunea unei transaminaze se poate obține un α-cetoacid. Un α-cetoacid se poate obține însă dintr-un aminoacid și prin acțiunea unei aminoxidaze, care favorizează transformarea α-hidroxiacidului în α-cetoacid. Formarea cetoacidului fie prin acțiunea transaminazei fie prin acțiunea oxidazei desemnează specificitatea de reacție pură.

Selectivitatea se referă la produșii de reacție.

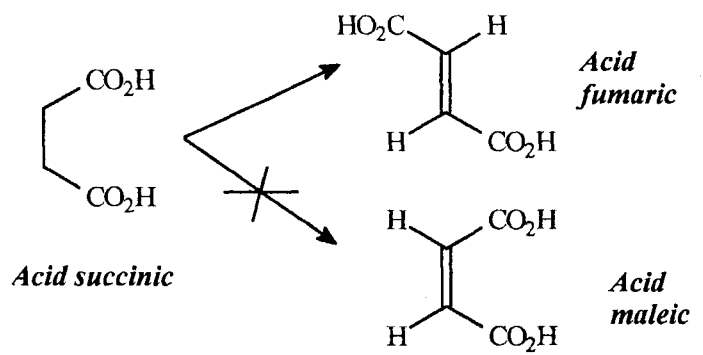


Fig.4.1.Selectivitatea enzimatică în cazul succcinat dehidrogenazei

Dacă produsul de reacție posedă izomeri geometrici se poate vorbi de *selectivitate cis-trans*: aceasta presupune formarea selectivă din același substrat doar a unui anume stereoizomer. Citățm cazul succinat de-

[38] Deși se cunosc și excepții.

hidrogenazei (*Fig.4.1*), care acționând doar asupra acidului succinic (deci posedă specificitate absolută) îl transformă doar (selectiv) în acid fumaric, fără formarea izomerului său, acidul maleic. În cazul în care în urma unei reacții se pot obține enantiomeri sau diasteroizomeri, preferința sistemului pentru unul sau altul dintre produșii de reacție poartă, după caz numele de enantio- sau diastereoselectivitate.

Enzimele pot fi de tip ***holoproteic*** sau de tip ***proteidic***. Componenta proteică a enzimelor de tip proteidic poartă numele de **apoenzimă**. **Cofactorul** (componenta neproteică) are fie funcție redox (preluare, cedare de electroni) fie funcție conformațională. În funcție de tăria legăturii cofactor-apoenzimă, cofactorii sunt **coenzime**, atunci când legătura este labilă, sau este **grupare prostetică** atunci când legătura este puternică. Asupra acestor aspecte vom reveni la paragraful legat de cofactori enzimatici și vitamine.

4.2. Clasificarea enzimelor

Pentru evitarea unor ambiguități, sistematizarea acestei importante clase a fost făcută de către Comisia Internațională de Enzimologie, (Enzyme Commission E.C.) organism subordonat Uniunii Internaționale de Biochimie (International Union for Biochemistry - I.U.B). Potrivit clasificării acestui for, enzimele se împart în șase clase:

1. **oxidoreductaze** – enzimele care catalizează reacții redox (transfer de electroni)
2. **transferaze** – catalizează transferul intermolecular de diferite grupări chimice
3. **hidrolaze** – catalizează scindarea hidrolitică a unor legături chimice
4. **liaze** – catalizează reacții de adiție sau eliminare la molecula unui substrat (cu implicarea unor duble legături, formate la eliminare, desfăcute la reacții de adiție),
5. **izomeraze** catalizează reacții de izomerizare
6. **ligaze (sintetaze)** – catalizează reacții de condensare a două molecule cu aportul energetic al unor nucleozidtrifosfați.

4.2.1. Codificarea enzimelor și nomenclatura

Datorită diversității de acțiuni chiar în interiorul unei clase a apărut necesitatea unor subclasificări care să țină seama de particularitățile diferitelor subclase de enzime. Pentru o mai ușoară identificare s-a ela-

borat un sistem de codificare potrivit căruia fiecare enzimă își are codul său, ușor de interpretat, care permite deslușirea acțiunii sale asupra unui substrat.

În conformitate cu acest cod enzimele au numele format din patru grupe de numere:

X. Y. Z. T.

X- codifică apartenența la una dintre cele șase clase de enzime.

Y, și Z, au semnificații particulare pentru fiecare clasă de enzime, putându-se referi după caz la substrat, cofactor, produs, grupă transferată etc., codificând sub și respectiv sub-sub clasa enzimatică.

T- codifică numărul de ordine, de regulă în succesiunea descoperirii, al enzimelor care catalizează reacții similare (vezi mai departe alcool dehidrogenaza și lactat dehidrogenaza).

De exemplu în cazul oxidoreductazelor: clasa 1. *subclasele* se sitematizează în 17, în funcție de natura grupărilor donoare de electroni, (1. -CH-OH, 2. carbonil, 3. -CH-CH-, 4. CH-NH_2, 5. CH-NH-, 6. NADH sau NADPH, 7. alți compuși cu azot, 8. grupare cu sulf, 9. grupare heminică, 10. difenoli, 11. apă oxigenată, 12. hidrogen, 13. încorporare de oxigen la un singur donor, 14. încorporare de oxigen la o pereche de donori, 15. radicali superoxid, 16. ioni metalici, 17. grupări -CH_2- *sub-subclasele* se sistematizează în funcție de natura acceptorului de electroni (1. -NAD+ sau NADPH+, 2. -citocrom, 3.-oxigen, 4.-compus disulfuric, 5. -chinonă, 6.-grupare cu azot, 7.-fier-sulf proteină, etc).

Astfel *alcool dehidrogenaza*, enzima care asigură oxidarea alcoolului etilic la acetaldehidă are codul E.C. 1.1.1.1 deoarece face parte din clasa oxidoreductazelor, folosește ca acceptor de electroni NAD^+, folosește ca donor de electroni CH_2-OH și este prima enzimă din sub-subclasa pe care o reprezintă.

Numele enzimelor poate fi comun sau sistematic.

A. ***Denumirea comună*** a enzimelor are un caracter istoric și practic totodată. Multe enzime se folosesc sub o astfel de denumire. Această denumire a fost inițial **nedescriptivă** precum:

- pepsina: hidrolizează proteinele la pH acid
- tripsina: hidrolizează proteinele la pH slab alcalin
- renina: coagulează laptele

ulterior, nomenclatura a fost îmbunătățită prin utilizarea numelui **substratului + aza:**

- α-amilaza: amidon → glucoză + maltoză + oligozaharide
- lactaza: lactoza → glucoză + galactoză

- lipaza: acilgliceroli → glicerol + acizi graşi
- maltaza: maltoză → glucoză
- ureeaza: uree + H_2O → $2NH_3 + CO_2$
- celobiaza: celobioză → glucoză

sau numele **reacţiei catalizate + aza**:

- alcool dehidrogenaza: $EtOH + NAD^+ \rightarrow AcH + NADH,H^+$
- glucozoizomeraza: glucoză → fructoză
- glucozoxidaza: D-glucoză + O_2 + H_2O → acid gluconic
- lactatdehidrogenaza: acid lactic → acid piruvic
- invertaza: zaharoza → glucoza + fructoza

B. ***Denumirea sistematică*** a enzimelor pleacă de la codificarea acestora. Conform prevederilor E.C. numele enzimei este format din două părţi:

- numele substratului sau al substratelor la reacţiile bimoleculare (în acest caz cele două substrate vor fi separate prin două puncte) şi
- numele reacţiei catalizate la care se adaugă sufixul *aza*.

Numele substratului se formează pe baza preceptelor I.U.P.A.C de nomenclatură admitându-se folosirea unor prescurtări pentru cofactori, de asemenea standardizate (NAD, ATP, FAD etc.).

Astfel invertaza, enzima care scindează hidrolitic zahărul (zaharoza) în fructoză şi glucoză va avea denumirea β-D-fructofuranozid-α-D-glucopiranozohidrolaza (*Fig. 4.2.*)

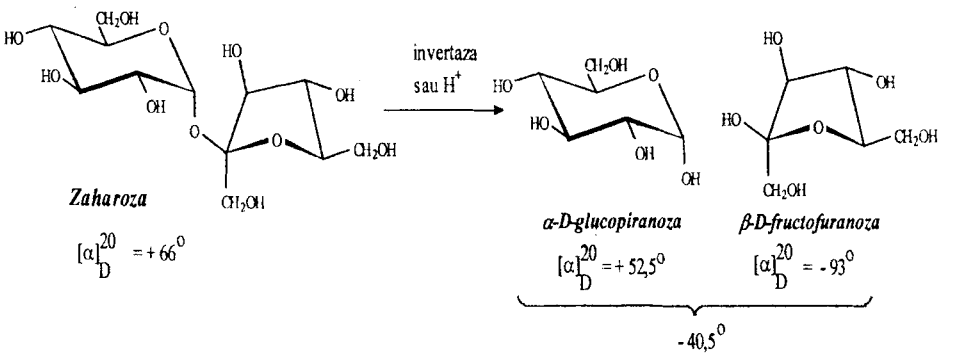


Fig.4.2. Inversia zaharozei

4.3. Cuantificarea activității enzimatice

Activitatea enzimatică măsoară capacitatea enzimei de a transforma un substrat. Studiul activității presupune existența unor metode de a pune cantitativ în evidență reacția catalitică. Pentru aceasta este necesară dozarea în dinamică fie a produsului de reacție, fie a substratului, fie a unui cofactor care poate fi pus în corelație cu formarea produsului sau cu consumul de substrat. Activitatea enzimatică depinde de o serie de condiții care trebuie cunoscute:

♦ *natura substratului.* Deoarece enzima posedă specificitate de substrat, activitatea sa va fi diferențiată cu natura acestuia, unele substanțe fiind transformate cu viteză mai mare decât altele.

♦ prezența sau absența unor *cofactori enzimatici.* Enzimele sunt substanțe de natură proteică. Anumite reacții presupun asistența unor compuși nu neapărat de natură proteică, care acționează ca donori, acceptori de fragmente moleculare (ionice) sau de electroni. În lipsa acestora reacția nu se poate produce, deși substratul are asigurate condițiile sterice necesare desfășurării reacției.

♦ *natura solventului.* Este importantă în experimentele „in vitro" dar și în cele „in vivo", atunci când intervin situații „anormale", patologice. Se știe că solventul influențează în primul rând conformația proteică, dar și viteza reacțiilor care decurg prin intermediari (sau prin stări de tranziție) polare.

♦ *compoziția ionică* (pH, ioni salini)

♦ temperatura

♦ *prezența factorilor străini* (concentrația oxigenului dizolvat, inhibitori, activtori).

Factorii de mediu care acționează asupra enzimelor au în cea mai mare măsură o determinare cinetică. Esențial este ca determinarea activității enzimatice să fie realizată în condițiile cunoașterii cantitative a acestor factori, premisă pentru asigurarea comparabilității datelor și eventual standardizarea condițiilor de determinare.

♦ Activitatea enzimatică se poate măsura prin intermediul ***numărului unităților de activitate*** numărul de unități molare (mirco-, nano-, picomoli) de substrat, transformați de o cantitate dată, dar neprecizată de preparat enzimatic în unitatea de timp. În funcție de unitatea de timp la care se face raportarea avem:

Unități internaționale (U.I.) - când se referă la un micro-, nano- sau picomol de substrat transformat pe minut. De exemplu 1 U.I. poate

semnifica transformarea unui μmol/min sau a unui pmol/ min. Aceste unități trebuie definite în prealabil.

katal (kat.) – când se referă la transformarea unui mol de substrat pe secundă. Se utilizează frecvent submultiplii acestei unități (mkat, μkat și nanokat.)

♦ altă posibilitate de măsură a activității enzimatice este ***activitatea specifică*** (AS.). Ea se exprimă în unități de activitate raportate la masa totală de proteină. Această unitate de măsură este importantă pentru urmărirea mersului operațiilor de purificare enzimatică.

♦ ***Gradul de purificare (Gp.),*** exprimă raportul activităților specifice între ultima treaptă de purificare și o treaptă în amonte (chiar a extractului brut).

♦ În fine, ***randamentul de purificare*** (η_p), reprezintă raportul dintre numărul total de unități în extractul inițial și numărul total de unități în preparatul purificat.

În *Tab.4.1.* se prezintă un exemplu al evoluției principalilor indicatori ai activității enzimatice în decursul unei operații de purificare a unui preparat enzimatic.

Tab.4.1. Principalii indicatori ai activității enzimatice pentru o operație de purificare (date convenționale)

	Proteină totală (mg)	U.I.	AS.	Gp	η_p
Extract	4000	8000	2.00	1.00	100
Fracția 1	1600	7600	4.75	2.37	95
Fracția 2	500	6500	13.0	6.50	81
Fracția 3	60	4500	75.0	37.5	56
Fracția 4	12	3000	250.0	125.0	37.5

4.4. Mecanismul de acțiune al enzimelor

Pentru a evita confuziile care sunt destul de frecvente, trebuie făcută distincția dintre *mecanism de acțiune* și *mod de acțiune*. **Mecanismul de acțiune** se referă la interacțiunea primară și la efectul chimic imediat care are loc (transformarea substratului în produs). Spre deosebire de această noțiune, **modul de acțiune** este mai complex, definind ansamblul de evenimente consecutive formării produsului.

Revenind, mecanismul de acțiune enzimatică presupune formarea unui „complex" enzimă - substrat, în fapt un intermediar de reacție. Formarea acestuia este rezultatul participării mai multor resturi de aminoacizi, nu neapărat adiacente, în sensul structurii primare a catenei

polipeptidice a enzimei, eventual a unor grupări active dintr-un cofactor prezent, pe de o parte și substrat pe de altă parte. Existența acestui intermediar este obiectivă, ea putând fi pusă în evidență prin mijloace specifice.

4.4.1. Stabilizarea stării de tranziție

Starea de tranziție este o caracteristică a tuturor reacțiilor chimice. Structura sa reprezintă o trecere între structura substratului (reactantului) și a produsului de reacție. Reacția simplă $S_{substrat} \rightarrow P_{rodus}$ are loc prin intermediul stării de tranziție $T^{\#}$, care este cea mai bogată în energie dintre toți componenții. Deoarece nivelul energetic al produsului, în exemplul considerat (vezi diagrama energetică – *Fig. 4.3*) este mai redus decât în cazul substratului, procesul global fiind însoțit de scăderea entalpiei libere (*endergonic*), succesiunea stărilor se poate scrie ca:

$$S \rightleftharpoons T^{\#} \longrightarrow P$$

Așa după cum este cunoscut, diferența dintre nivelul energetic al stării de tranziție și al substratului reprezintă *energia liberă de activare.*

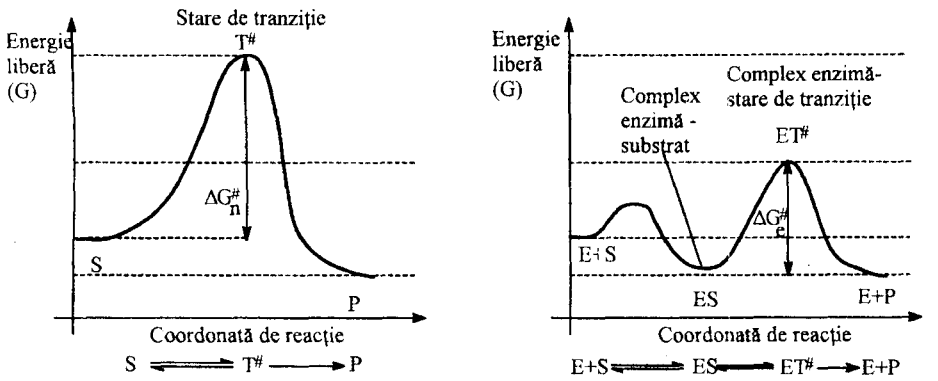


Fig.4.3. Diagramele energetice pentru reacție necatalizată (stânga) și o reacție realizată în cataliză enzimatică (dreapta)

Pentru o reacție catalizată enzimatic, apare cel puțin o interacțiune moleculară suplimentară concretizată printr-o stare proprie de tranziție și formarea unui intermediar[39] numit *complex enzimă – substrat.* Aceasta trece printr-o nouă stare de tranziție, cu energie superioară primeia, de unde și reversibilitatea celor două reacții (*Fig.4.3.*). Variația

[39] Se știe că, spre deosebire de starea de tranziție, un intermediar are energia mai redusă. Mai mult, pe diagrama energetică un intermediar se găsește între două stări de tranziție, energia sa constituind un minim local.

de energia pentru formarea stării de tranziție $ET^{\#}$ este net inferioară stării $T^{\#}$, adică

$$\Delta G_n^{\#} > \Delta G_e^{\#}, \qquad [4.1]$$

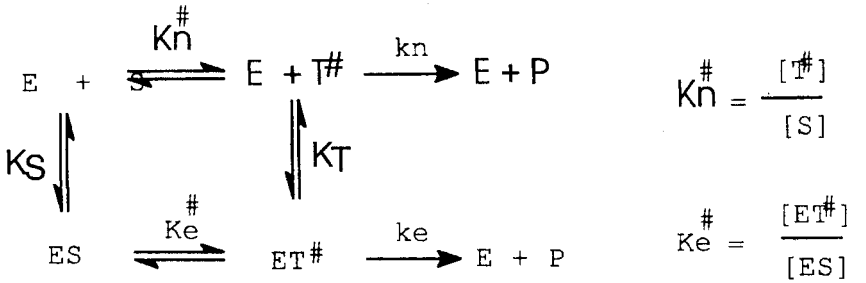


Fig. 4.4. Diagrama formală a transformării enzimatice, necatalitice cu evidențierea constantelor de disociere a enzimei de pe substrat, respectiv starea de tranziție

fapt ce justifică cel puțin în parte accelerarea vitezei de reacție. Un alt factor care contribuie la accelerare este stabilizarea complexului $ET^{\#}$. Altfel spus enzimele sunt substanțe care leagă starea de tranziție mult mai puternic decât substratul sau produsul de reacție. Constanta de disociere a complexului ES:

$$K_S = \frac{(E)\cdot(S)}{(ES)} \qquad [4.2.]$$

iar constanta de disociere a complexului de tranziție este:

$$K_T = \frac{(E)\cdot(T^{\#})}{(ET^{\#})} \qquad [4.3.]$$

Cataliza enzimatică necesită ca $K_T < K_S$. În acord cu teoria stării de tranziție, raportul constantelor de viteză catalizată și necatalizată sunt corelate cu K_T și K_S prin relația:

$$\frac{k_e}{k_n} = \frac{K_S}{K_T} \qquad [4.4.]$$

Într-adevăr:

$$k_e = \frac{k_B \cdot T}{h}\cdot K_e^{\#} \qquad \text{și} \qquad k_n = \frac{k_B \cdot T}{h}\cdot K_n^{\#} \qquad [4.5.]$$

Făcând raportul celor două constante de viteză se obține:

$$\frac{k_e}{k_n} = \frac{K_e^{\#}}{K_n^{\#}} \qquad [4.6.]$$

Explicitând cele două constante de echilibru se obține:

$$\frac{K_e^{\#}}{K_n^{\#}} = \frac{(ET^{\#})\cdot(S)}{(ES)\cdot(T^{\#})} \qquad [4.7.]$$

Admițând că valoarea concentrației de echilibru a enzimei este aceeași și în cazul disocierii enzimei de pe complexul enzimă-substrat și în cazul disocierii complexului enzimă-stare de tranziție, constantele de echilibru $K_n^{\#}$ și $K_e^{\#}$ însă pot fi puse în legătură cu constantele de disociere K_S și K_T:

$$\frac{K_e^{\#}}{K_n^{\#}} = \frac{(ET^{*})\cdot(S)\cdot(E)}{(ES)\cdot(T^{\#})\cdot(E)} \quad \textit{ceea ce este echivalent cu} \quad \frac{K_e^{\#}}{K_n^{\#}} \approx \frac{K_S}{K_T} \qquad [4.8.]$$

demonstrându-se astfel că accelerarea vitezei de reacție de către enzime este aproximativ egală cu raportul constantelor de disociere enzimă-substrat și complexul enzimă-stare de tranziție. Schema generală prezentată în *Fig.4.4.* oferă un tablou al corelațiilor dintre mărimile mai sus prezentate.

Accelerarea vitezei reacțiilor enzimatice față de cele neenzimatice este foarte mare (cu 7 până la 16 ordine de mărime) și își are corespondentul în reducerea substanțială a energiei libere de activare.

Din coordonata de reacție se poate deduce că scăderea energiei de activare în cazul reacțiilor enzimatice se poate realiza pe două căi:

- prin ***reducerea nivelului energetic al complexului enzimă - stare de tranziție*** (complex activat) ceea ce presupune o legare puternică de către enzimă a stării de tranziție, fapt demonstrat mai sus și:
- prin ridicarea nivelului energetic al complexului enzimă - substrat. Cu alte cuvinte, acest complex va fi destabilizat.

Complexul enzimă - substrat se realizează prin intermediul unor interacțiuni suplimentare, care pot coborî nivelul energiei libere cu ΔG_i (energie liberă de legare intrinsecă), mărind astfel diferența de energie liberă dintre complexul activat și complexul enzimă-substrat. Prin aceasta, eficiența acțiunii enzimatice va fi puternic redusă.

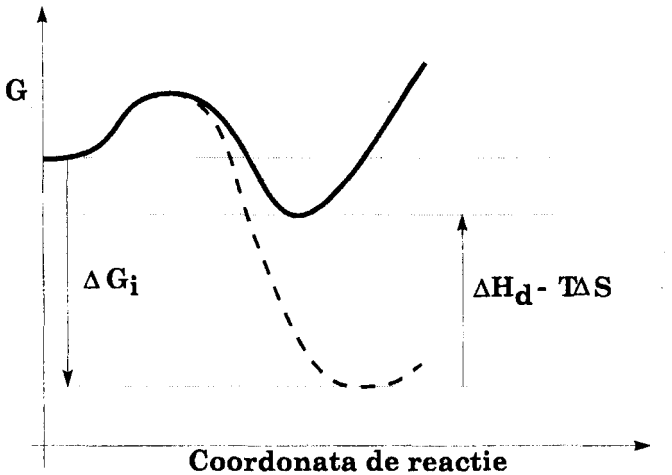


Fig. 4.5. Reprezentarea destabilizării complexului enzimă - substrat

Destabilizarea complexului enzimă-substrat poate fi privită din punctul de vedere al celor două componente energetice: termenul entalpic şi termenul entropic. Termenul entalpic reflectă existenţa unor tensiuni în sistemul molecular, care ridică nivelul energetic al acestuia. De TARR sistematizează contribuţia *entalpiei de destabilizare* ΔH_d în patru termeni:

entalpia formală de legare (EFL)
entalpie formală sterică (EFS)
entalpie formală polară (EFP)
entalpie formală de mediu (EFM)

Entalpia formală de legare este termenul energetic pozitiv, atribuit modificărilor lungimii legăturilor, şi ale unghiurilor de valenţă de la valorile „normale", care apar la formarea unor legături chimice sau fizice, datorită ambianţei în care are loc formarea acestora. Exemplul clasic este cel al ciclopropanului în comparaţie cu al ciclohexanului. Nesuprapunerea perfectă a orbitalilor sp^3 ai atomilor de carbon, ridică nivelul energetic al metilenilor printr-o contribuţie EFL.

Forţarea conformaţiei eclipsate ridică nivelul energetic al moleculei printr-o contribuţie de tip EFS. Luând un alt exemplu, n-butanul gauche, energia sa este mai ridicată datorită repulsiei dintre cei doi metili în comparaţie cu izomerul anti. Atunci când ambianţa forţează mai mult unghiul diedru din molecula n-butanului la o valoare diferită de 60, 120 sau 180° apar tensiuni suplimentare datorate abaterii de la conformaţiile intercalate situate pe minime energetice locale, tot ca rezultat al apariţiei unei entalpii formale sterice.

Efectul anomeric observat la hidrații de carbon, poate fi privit ca un rezultat al repulsiei dipol-dipol dintre legăturile C_1-OH și C_1-OCH-, exemplificând apariția unei **entalpii formale polare**, care justifică stabilitatea anormal de ridicată a anomerului α.

În fine, creșterea nucleofilicității anionilor în solvenți apolari justifică apariția efectului **entalpiei formale de mediu.**

Această sistematizare este utilă pentru studiul teoretic al structurilor implicate. În fapt, experimental efectele sunt imposibil de separat, pentru că interacțiunile care destabilizează complexul enzimă-substrat au o determinare spațială, valoarea accesibilă este entalpia de formare, o mărime globală, rezultativă, care este mai mare decât în cazul referinței. Ca referință se consideră entalpiile de formare ale enzimei, respectiv substratului în soluții apoase.

Pe lângă termenul entalpic, reducerea stabilității complexului enzimă-substrat este datorată scăderii entropiei sistemului prin pierderea unor grade de libertate de rotație, translație, atât ale enzimei cât mai ales a substratului, în urma legării.

Trebuie subliniat, că, dată fiind realitatea formării complexului enzimă-substrat, variația globală de energie liberă este negativă. De aceea destabilizarea de esență entalpică și entropică este compensată de o stabilizare esențialmente entalpică, rezultat al formării unor noi legături.

Relația [4.6.] permite estimarea constantei de disociere a complexului enzimă + stare de tranziție. Accelerarea vitezei de reacție pentru reacția catalizată de enzime față de reacția necatalizată poate ajunge la 10^{16} cu valori tipice de 10^{12}. Aceasta înseamnă că pentru o constantă de disociere a complexului enzimă-substrat K_S de ordinul 10^{-4} M constanta de disociere a complexului enzimă-stare de tranziție K_T va avea valoarea $10^{-4} / 10^{12} = 10^{16}$ ceea ce este o valoare extrem de redusă.

Formalismul exprimat prin relația [4.4] care afirmă că enzimele leagă mai puternic starea de tranziție decât substratul poate fi obiectivat experimental prin utilizarea unor analogi ai stării de tranziție, în fapt molecule cu structură similară acesteia. În contact cu enzima acești compuși sunt legați mai puternic decât substratul propriuzis. Au fost descrise sute de astfel de exemple. Unul dintre acestea, semnificativ, este realizat pe prolin racemază. Această enzimă realizează inversia de configurație a L-prolinei la D-prolină, prin intermediul unei stări de tranziție plane:

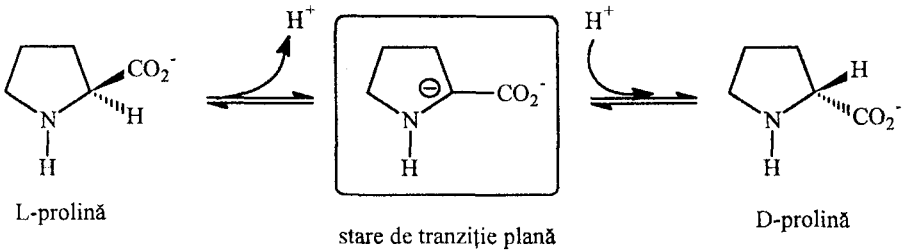
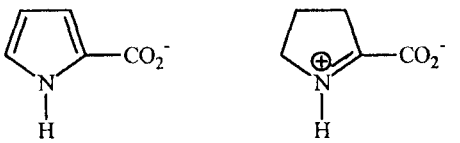


Fig.4.6. Reprezentarea structurii stării de tranziție în reacția de racemizare a prolinei

Studiind inhibitorii acestei enzime, Robert ABELES, a găsit că pirol–2-carboxilatul leagă enzima de 160 de ori mai puternic decât L-prolina, substratul normal. Acest compus are o structură plană a centrului de reacție similară cu a stării de tranziție proprii substratului. De asemenea D–1-pirolidin-carboxilatul, un alt analog plan, are o comportare asemănătoare:

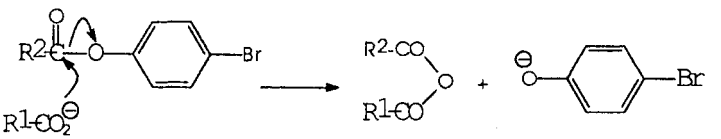


Pirol-2-carboxilat Δ-1-pirolidin-2-carboxilat

Alte exemple sunt oferite de fosfoglicolohidroxamat care este un analog al stării de tranziție a aldolazei, o enzimă găsită în glicoliză care scindează reversibil 1,6-difosfofructoza (esterul lui Haarden-Young) la fosfodihidroxiacetonă și aldehida 3-fosfoglicerică, precum și de forma hidratată a ribonucleozidei purinei, analog al stării de tranziție a adenozindeaminazei, enzimă care transformă adenozina în inozină (ribonucleozida hipoxantinei).

Un aspect care ar putea fi discutat este faptul că enzimele nu catalizează reacțiile chimice. Ele catalizează schimbări de stare, care pot fi descrise ca procese, transformări, conversii. Termenul reacție implică un anume set de reactanți care parcurge o anume coordonată de reacție. Enzimele realizează funcția catalitică, de accelerare a vitezei de reacție prin faptul că asigură căi alternative, de transformare a substratului în produs. Datorită faptului că energia de activare pe căile enzimatice este mai redusă comparativ cu reacția desfășurată în absența enzimei, calea enzimatică este varianta preferată. Faptul că interesează în primul rând substratul și produsul reacției chimice (realizate în prin mijlocire enzimatică) este argumentul esențial al folosirii largi a termenului de cataliză enzimatică.

4.4.2. Modalităţi concrete de reducere a energiei de activare în reacţiile enzimatice



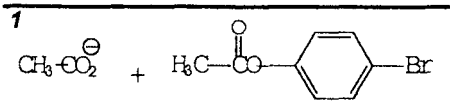
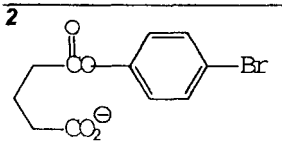
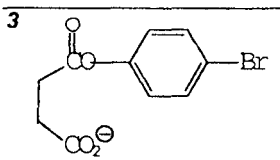
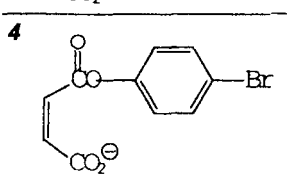
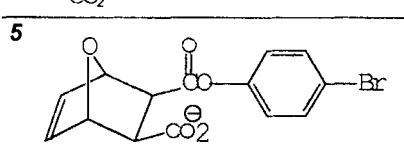
Reactanţi	k2 / k1
1 	1
2 	1 x3 M0
3 	~2,2 5xM10
4 	1 x7 M0
5 	5 x7 M0

Fig.4.7. Materializarea efectului de proximitate în reacţia de formare a diferitelor anhidride

Reducerea entalpiei de activare printr-un act catalitic enzimatic se bazează pe de o parte pe **efectele de proximitate** care constau în aducerea speciilor reactante în vecinătate reciprocă, pe de altă parte în stabilizarea stărilor de tranziţie prin **furnizarea unor contrasarcini** prin cataliza generală acido-bazică ori prin participarea metalelor sau prin **formarea unor intermediari covalenţi** prin atac nucleofil, mai rar electrofil.

4.4.2.1. Efectele de proximitate

Sunt legate de procesul catalitic, constau în realizarea apropierii spațiale a speciilor reactante, precum și orientarea favorabilă reciprocă a acestora. Intuitiv, se știe că reacțiile chimice intramoleculare sunt mult mai rapide decât cele intermoleculare în condițiile în care sunt implicate aceleași grupări funcționale. Exemplul tipic compară viteza de formare a anhidridei acetice cu cele de formare a anhidridei malonice, succinice, cu rezultatul cunoscut că în primul caz viteza de reacție este mult mai mică.

Cauza acestui fenomen este simplă și se referă la modificările entropice care însoțesc formarea stării de tranziție. În cazul reacțiilor intermoleculare, scăderea entropiei de activare este cu mult mai pregnantă decât în cazul reacțiilor intramoleculare. Efectul entalpic fiind comparabil, scăderea entalpiei libere de activare este în consecință mai ridicată la reacțiile intramoleculare, acestea fiind deci mai rapide.

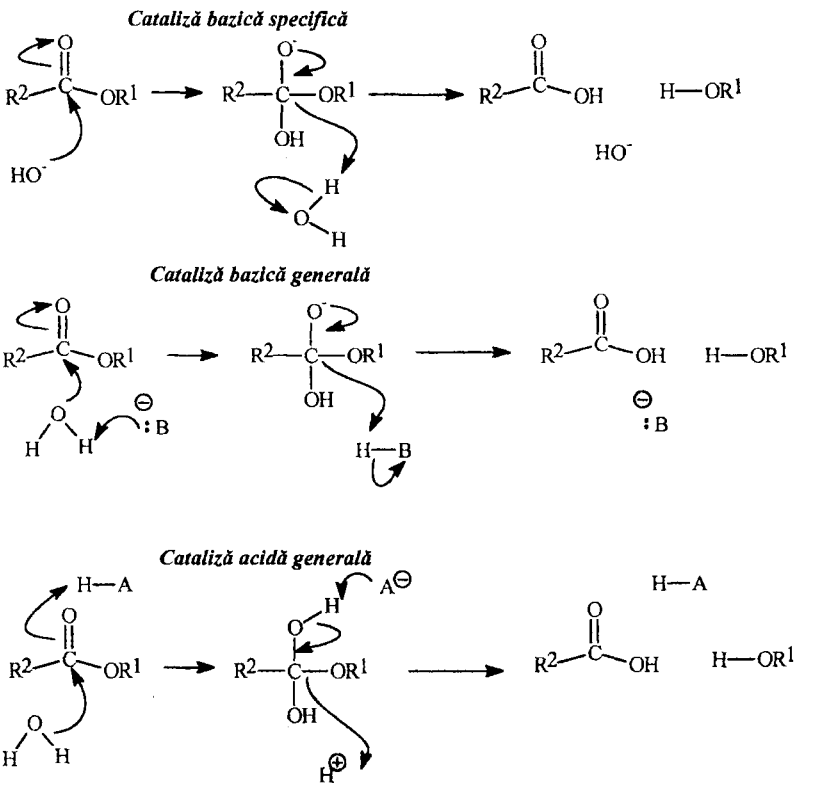


Fig.4. 8. Exemple de cataliză acido-bazică specifică și generală în reacția de hidroliză a esterilor

Cantitativ, eficiența intramolecularității se poate calcula din raportul constantelor de viteză unimoleculară (reacțiile 2–5 *Fig. 4.7.*) per bimoleculară, (reacția bimoleculară aleasă ca referință dintre acetat și acetatul de 4-bromofenil). Raportul are dimensiune molară (M) care poate fi interpretată ca **molaritate efectivă**. Prin această mărime desemnăm, în condițiile exemplului prezentat, multiplul de moli de acetat de 4-bromofenil, care în reacția cu un număr de moli de acetat liber, va da aceeași viteză de reacție ca și a reacției unimoleculare 2,3,4 sau 5 (Aceeași *Fig. 4.7.*). Cu alte cuvinte molaritatea efectivă, reprezintă un factor de amplificare datorat proximității particulare. În cazul catalizei enzimatice, de regulă, nu se poate vorbi de o intramolecularitate propriuzisă deoarece grupările reactive nu aparțin aceleiași specii moleculare (definită ca entitate covalentă). Amplificarea printr-o proximitate forțată are loc așa cum s-a prezentat mai sus, prin aducerea speciilor reactante în vecinătate și într-o orientare favorabilă.

4.4.2.2. Cataliza generală prin acizi și baze.

Este întâlnită în multe dintre procesele biocatalitice. Așa după cum se cunoaște, interacțiunea directă a H+ sau HO- cu substratul, finalizată prin transformarea substratului în produs și regăsirea H^+ sau HO^- este denumită cataliză acidă sau bazică specifică, în timp ce interacția unui acid sau bază alții decât apa, cu molecule de apă, cu generarea unor specii care reacționează cu substratul este denumită cataliză acidă sau bazică generală (*Fig. 4.8.*).

4.4.2.3. Cataliza covalentă

Fie reacția neenzimatică:

$$S_1 - X + S_2 \rightleftharpoons S_1 - S_2 + X$$

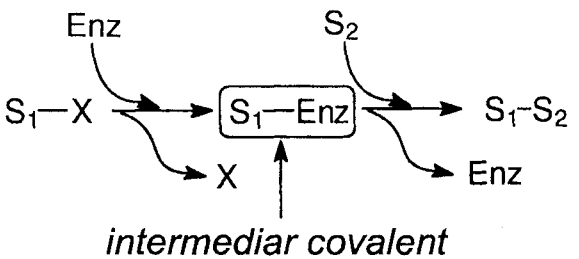


Fig. 4.9. Schema catalizei enzimatice prin formare de intermediari covalenți

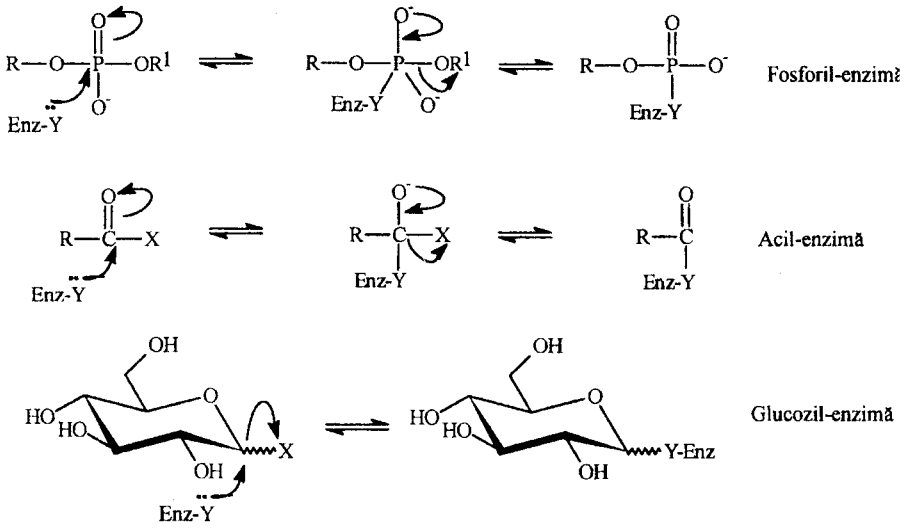


Fig. 4.10. Exemple de cataliză enzimatică cu formare de intermediari covalenți

Prin cataliză enzimatică, pe lângă posibilitățile mai sus enunțate, se poate ajunge la creșterea vitezei de reacție și prin formarea covalentă a unor intermediari. În acest caz, condiția necesară pentru o cataliză enzimatică să fie o alternativă eficientă față de reacția necatalitică, este pe de o parte ca grupele funcționale din catenele laterale ale aminoacizilor care atacă substratul să fie mai reactive decât reactantul utilizat în procesul necatalitic, iar pe de altă parte, structura nou atașată substratului (care conține și componenta enzimatică), să fie o grupă mai fugace decât cea preexistentă în substratul inițial. Cataliza covalentă presupune un mecanism secvențial în care are loc formarea unui intermediar covalent între enzimă și substrat. Mecanismul general este redat în *Fig. 4.9*:

De cele mai multe ori, formarea intermediarului covalent S_1 - Enz este rezultatul unui atac nucleofil al componentei Y a enzimei asupra unui centru deficitar în electroni al substratului S1. (*Fig. 4.10.*). Dintre centrii nucleofili ai enzimelor, Y, putem cita: grupe amino (lisină), carboxilat (acid glutamic, aspartic), hidroxil alifatic sau aromatic (serină, treonină, tirosină), imidazol (histidină), tiol (cisteină). Dintre țintele atacului nucleofil exemplificăm atomul de fosfor din resturile fosforil, atomul de carbon dublu legat de oxigen, carbonul glicozidic etc. (*Fig.4.10.*)

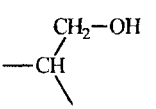
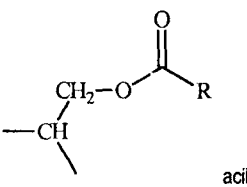
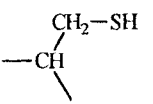
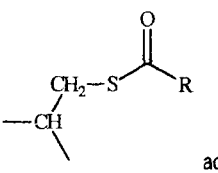
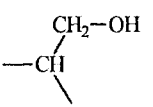
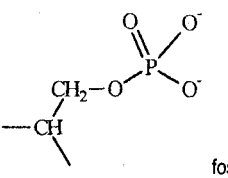
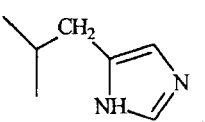
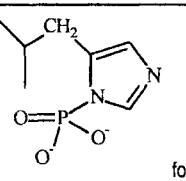
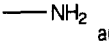
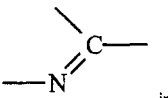
Intermediarii formați vor conduce la produșii finali prin mecanisme de substituție nucleofilă realizate prin atacul unui al doilea substrat, fie

la carbonul sp^3, fie (prin adiție - eliminare) la carbonul sp^2, fosfor (din fosfat) sau sulf (din sulfat) etc.

Există și cazuri de cataliză electrofilă, care de regulă implică participarea unor cofactori enzimatici, de regulă ioni metalici, capabili prin deficitul electronic, să joace rol de electrofili.

În *Tab.4.2* sunt listate o serie de enzime care formează intermediari legați covalent, inclusiv *glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza*, o enzimă din glicoliză, care catalizează fosforilarea oxidativă a glicerinaldehid-3-fosfatului (esterul lui Fischer), în care atacul nucleofil se realizează prin intermediul unei grupări tiolice a unei cisteine prezente în situsul catalitic:

Tab. 4.2. Enzime care formează intermediari covalenți:

Enzime	Grupă reactivă din enzimă	Intermediar covalent
-Chimotripsina -Elastaza -Esteraze -Subtilisina -Trombina -Tripsina	 serina	 acilserina
-Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza -Papaina	 cisteina	 acilcisteina
-Fosfataza alcalină -Fosfogulcomutaza	 serina	 fosfoserina
-Fosfogliceratmutaza -Succinil-CoA sintetaza	 hist idina	 fosfohistidina
- Aldolaza - Decarboxilaze - Enzime piridoxalfosfat dependente	 amino	 imină (bază Schiff)

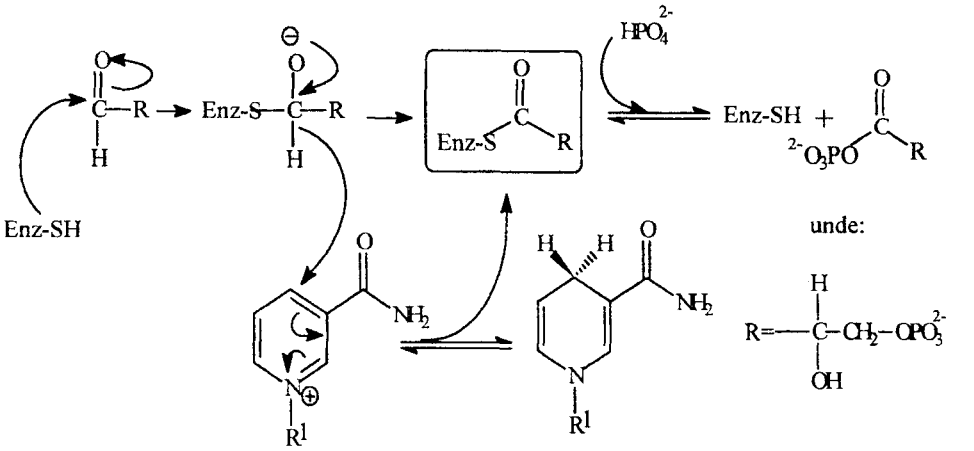


Fig.4. 11. Fosforilarea oxidativă a aldehidei fosfoglicerice, exemplu de mecanism realizat prin intermediari covalenţi

4.4.2.4. Cataliza prin ioni metalici

Multe dintre enzime acţionează prin intermediul ionilor metalici, de regulă tranziţionali. Aceşti ioni sunt necesari fie pentru stabilizarea permanentă a structurii enzimelor, în cazul metalenzimelor, fie doar pentru actul catalitic propriuzis, în cazul enzimelor metal activate.

Ionii metalici, intervin în actul catalitic enzimatic prin două modalităţi:

În primul rând, prin capacitatea de a prelua sarcini negative, ei pot stabiliza centrii cu densitate electronică ridicată care pot apare în decursul reacţiilor chimice. Exemplul tipic este oferit de alcool dehidrogenaza hepatică, unde ionul Zn^{2+} stabilizează sarcina parţial pozitivă care apare la carbonil.

Cea de-a ***doua posibilitate*** este consecinţa capacităţii metaloenzimelor sau a enzimelor metal activate de a furniza nucleofili puternici la pH fiziologic. Nucleofilul se generează, după o prealabilă deprotonare, favorizată de polarizarea structurii, datorată interacţiunii metal - ligand. Ligandul sărăcit în electroni va putea expulza un proton:

$$Me^{2+} + NuH \rightleftharpoons Me^{2+}(NuH) \rightleftharpoons Me^{2+}(Nu^-) + H^+$$

De exmplu, carboxipeptidaza A conţine Zn^{2+} care facilitează deprotonarea apei.

4.4.3. Interacțiunea substrat - enzimă

Zona în care se situează aminoacizii care interacționează cu substratul în vederea realizării actului catalitic poartă numele de ***situs catalitic***, (sit, situs activ sau centru activ sunt termeni sinonimi utilizați în egală măsură). Situsul catalitic are o topologie determinată de structurile de ordin superior (terțiară și cuaternară), contactul cu substratul fiind deopotrivă consecutivă și simultană unor adaptări conformaționale ale enzimei. Aceste modificări sunt necesare pătrunderii substratului în interiorul moleculei de enzimă, în situsul catalitic. În același timp și substratul suferă o modificare conformațională care să faciliteze interacțiunea. Un exemplu de interacțiune între lactat dehidrogenază și acidul lactic este redată în *Fig. 4.12.*:

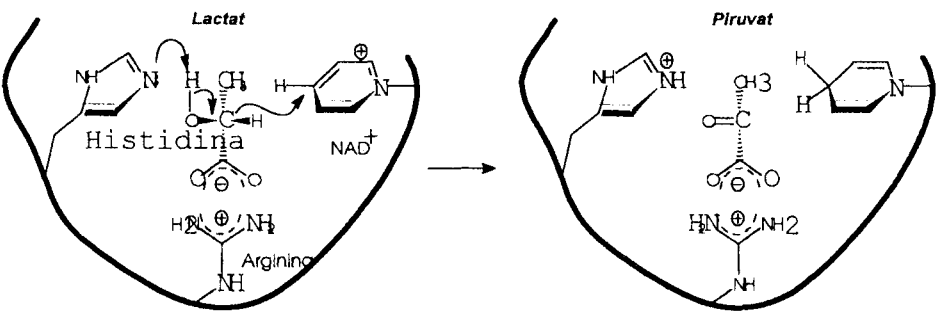


Fig. 4. 12. Situsul catalitic al lactatdehidrogenazei și mecanismul reacției de dehidrogenare a acidului lactic catalizat de aceasta

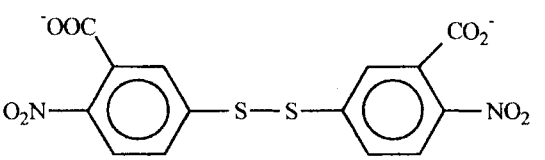
Interacțiunea situs catalitic, substrat este complexă și, datorită labilității conformaționale a catenei polipeptidice este dificil de investigat. Principial, studiile de interacțiune se bazează pe blocarea selectivă a resturilor de aminoacizi și urmărirea efectului asupra activității enzimei. Fără a se putea face o delimitare precisă aminoacizii constituenți ai unei enzime pot fi încadrați într-una din următoarele categorii:

- *de contact*; fixează substratul și participă nemijlocit la actul catalitic
- *conformaționali*; stabilizează conformația situsului catalitic
- *auxiliari*; interacționează cu substratul fără a participa direct la actul catalitic
- *indiferenți;* ceilalți aminoacizi.

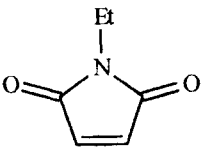
4.4.3.1. Reactivi care permit studiul situsului activ.

4.4.3.1.1. Reactivi pentru grupele tiolice:

Grupele tiolice pot fi dozate şi totodată blocate prin utilizarea **5,5'-ditio-bis-2-(nitrobenzoat)-ului (DTNB).** Acest reactiv, prin reacţia cu grupările SH libere formează un compus fotometrabil la 413 nm. (e= 13600 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Prin reacţia cu grupele tiolice libere, acest reactiv formează punţi disulfurice în componenta proteică, rupându-şi propria punte disulfurică. Un alt reactiv utilizabil în acelaşi scop este **N-etil-maleilimida (NEM).** Acesta va da o reacţie de tip adiţie Michael cu gruparea tiolică, blocând-o. Tot ca reactiv de blocare a grupărilor tiolice poate fi folosit şi iodoacetatul sau acrilonitrilul (vezi determinarea structurii primare a proteinelor).



5,5' ditio-bis- 2-nitrobenzoat (DTNB)



N-etil-maleilimida (NEM)

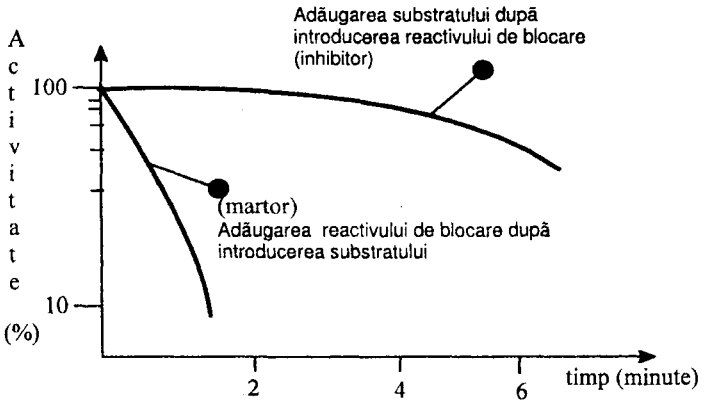


Fig. 4.13. Efectul existenţei prealabile a substratului în reacţia de blocare cu un reactiv specific

La utilizarea reactivilor de blocare apare o problemă metodologică, legată de prezenţa substratului.

În prezenţa iniţială a substratului inhibiţia activităţii catalitice este mai puţin pregnantă datorită competiţiei între substrat şi inhibitor pe

situsul catalitic care conține grupările tiol. Dacă însă substratul se adaugă ulterior inhibitorului scăderea de activitate este mult mai pregnantă, deoarece grupările tiolice tind să fie saturate cu inhibitor. În cazul în care grupările tiolice nu intervin în situsul catalitic prezența inhibitorului nu are nici un efect asupra activității enzimatice.

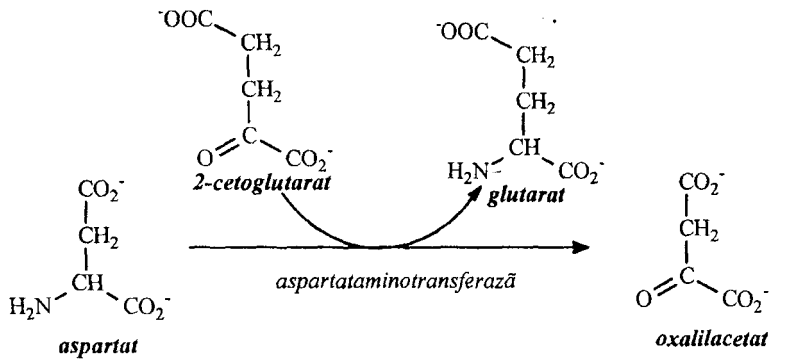


Fig.4.14. Reacția catalizată de o aspartataminotransferază

Există și cazuri în care prezența substratului mărește viteza de inactivare a enzimei în prezența inhibitorului. Aceste cazuri sunt indicii ale unor modificări conformaționale. Un exemplu este aspartat aminotransferaza din inima de porc. Aspartat aminotransferaza catalizează reacția de transformare a acidului aspartic în acid oxalilacetic (*Fig. 4.14.*). Această enzimă conține două subunități, fiecare dintre acestea conținând câte cinci grupe tiolice.

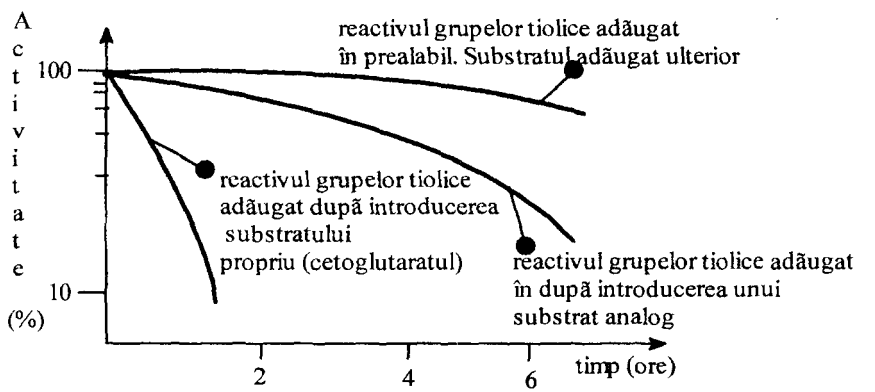


Fig. 4.15. Efectul reactivilor grupelor tiolice asupra activității aspartat-aminoatransferazei în prezența substratului propriu și analog

Fiecare subunitate are accesibile doar două grupe tiolice libere. Toate celelalte pot fi titrate cu NEM sau DTNB doar după denaturare. Tratând enzima nativă cu NEM sau DTNB se constată o slabă inactivare. Această inactivare lentă este datorată unei a treia grupări tiolice care reacționează lent cu reactivul de blocare. În prezența unui substrat analog, viteza de inactivare crește, și ea se accelerează puternic în prezența substratului tipic și chiar a sistemului glutarat - oxoglutarat. (*Fig. 4.15.*) Cercetări ulterioare au confirmat că cea de-a treia grupare tiol, implicată în denaturarea lentă nu se găsește în situsul activ dar el împiedică probabil conformațional activitatea enzimatică.

4.4.3.1.2. Reactivi pentru histidină.

Se realizează prin intermediul **dietilpirocarbonatului** (DEPC). N-carbetoxiderivatul absoarbe la 242 nm. Îndepărtarea reactivului se poate face cu hidrazină. Alți reactivi de blocare ai histidinei sunt **cloroacetona**, sau **bromoacetona** (*Fig.4.16*).

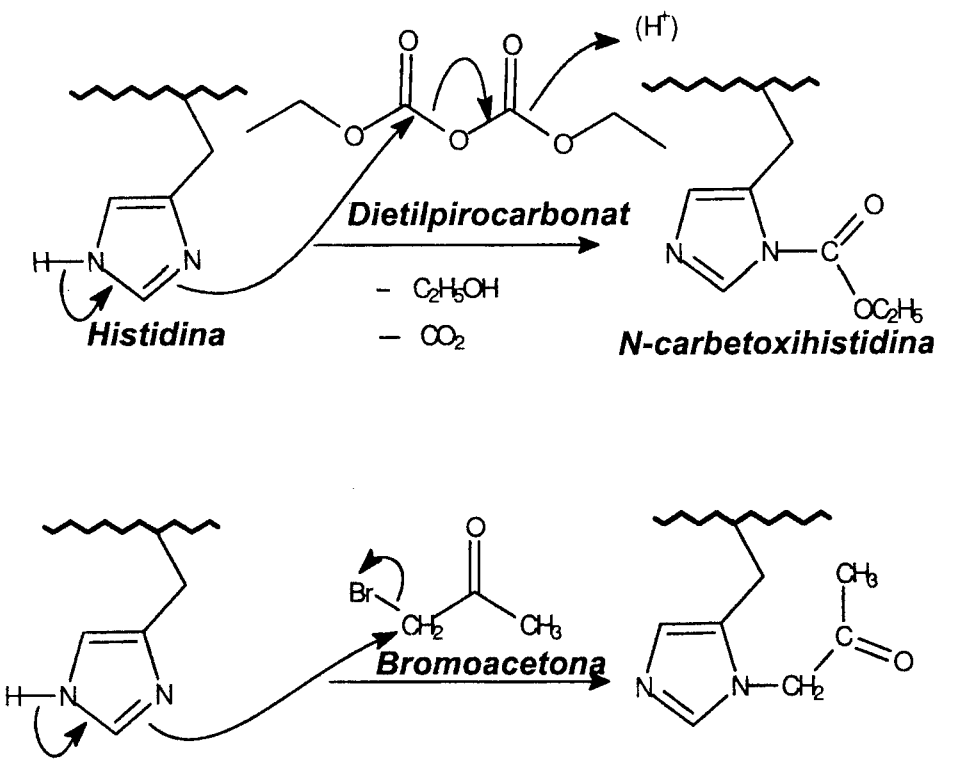


Fig. 4.16. Blocarea resturilor imidazolice ale histidinelor

4.4.3.1.3. Reactivi pentru grupările carboxilice

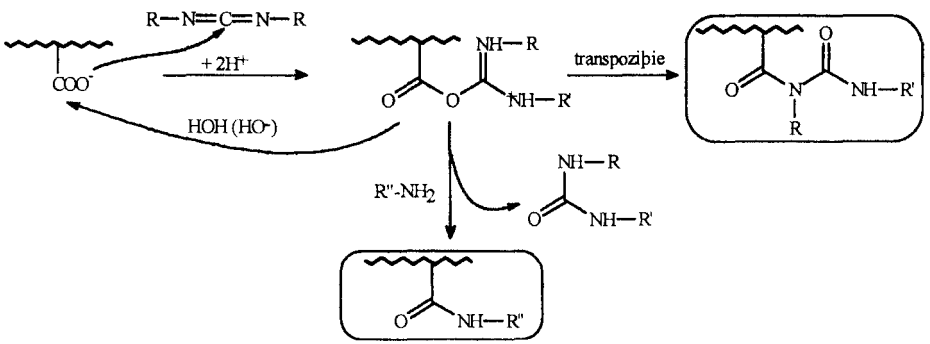
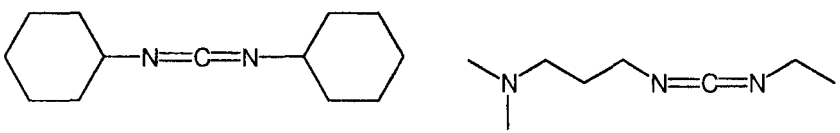


Fig.4. 17. Blocarea grupărilor carboxil după prealabila activare cu carbodiimide

Se realizează prin intermediul **carbodiimidelor.** Intermediarii formați prin activare cu aceste carbodiimide sunt extrem de sensibili la acțiunea nucleofililor, care realizează adevărata blocare a carboxililor inițiali (*Fig. 4.17.*).



Diciclohexilcarbodiimida (DCC) ***Etil-1-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC)***

Fig.4. 18. Exemple de carbodiimide frecvent utilizate în activarea carboxililor

Blocarea grupărilor carboxilice depinde de accesibilitatea (sterică și ambientală hidrofob-hidrofilă) a acestora. **Diciclohexilcarbodiimida** (DCC), puțin polară, solubilă în metanol, va fi utilă pentru blocarea carboxililor apropiați grupărilor hidrofobe. Pentru vecinătăți hidrofile se utilizează **etil-1-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida** (EDAC) care este mai hidrosolubilă (*Fig. 4.18*).

4.4.3.1.4. Reactivi pentru grupările aminice ale lisinei

se realizează cu anhidridă maleică ori cu anhidridă succinică. Prin astfel de acilări se realizează trecerea de la forma bazică a restului (NH_2) la cea acidă a carboxilului.

Fig. 4.19. Blocarea capătului ε-amino al lisinei prin maleinilare

Gruparea ε-amino din lizină mai poate fi blocată și prin utilizarea unei aldehide, cat în care se formează o aldimină.

4.4.3.1.5. Reactivi pentru grupările OH din serină

se realizează cu **diizopropilflorofosfat** (DIP):

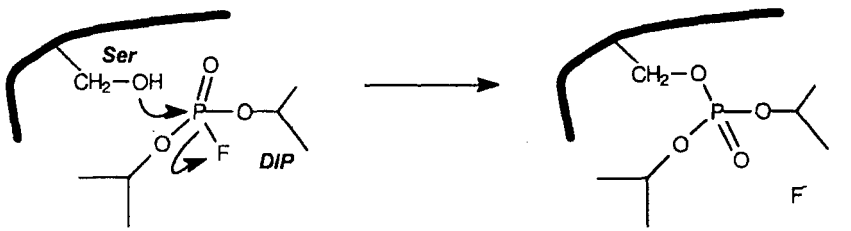


Fig. 4.20. Blocarea resturilor serinice prin fosfatare cu DIP

4.4.3.1.6. Reactivi pentru grupările OH din tirozină

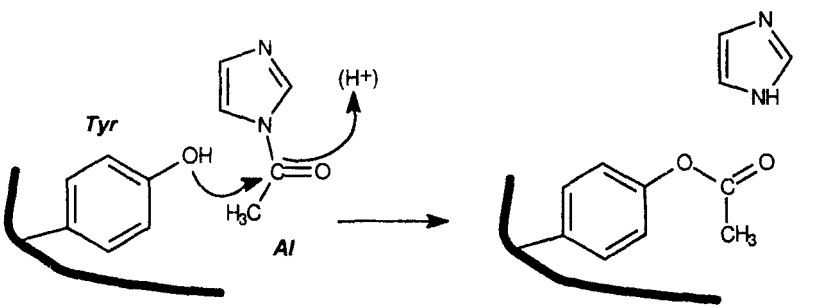


Fig. 4.21. Blocarea tirozinei

se realizează cu **N-acetilimidazol** (NAI) (*Fig. 4.21*).

4.4.3.1.7. Reactivi pentru resturile de triptofan

se realizează cu **bromură de 2-hidroxi–5-nitrobenzil** (*Fig. 4.22.*)

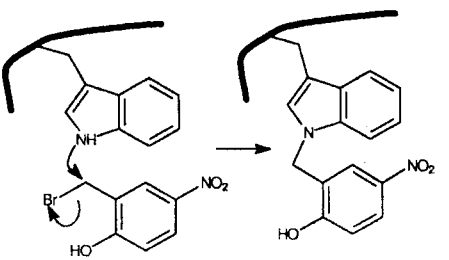


Fig. 4.22. Blocarea resturilor de triptofan

4.4.3.1.8. Reactivi pentru resturile de arginină

se face cu 1,2- ciclohexandiona (*Fig. 4.23.*)

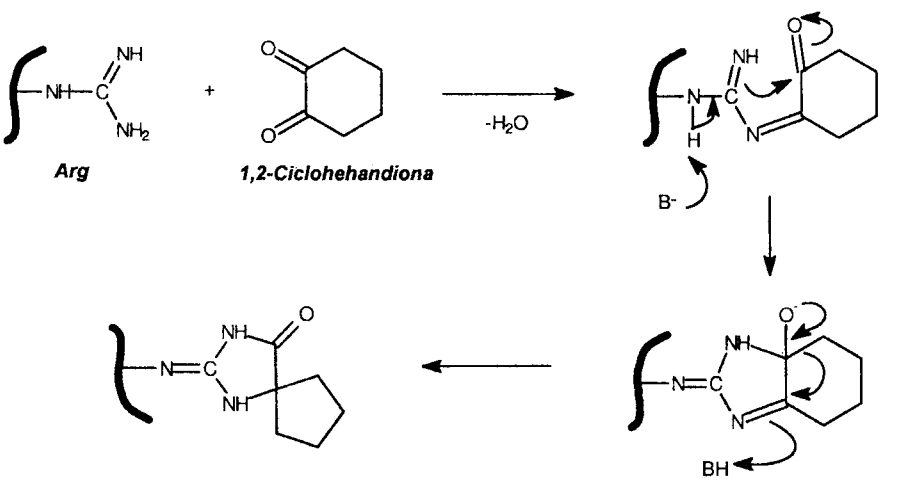


Fig. 4.23. Blocarea resturilor de arginină

4.4.4. Enzime holoproteice

4.4.4.1. Serin proteazele

Formează una dintre cel mai bine caracterizate familii de enzime atât sub aspectul mecanismului de reacție cât și al structurii. Sunt enzime care scindează legătura peptidică. Această familie include: *tripsina, chimotripsina, elastaza, trombina, subtilizina, plasmina, activatorul*

plasminogenului tisular și alte enzime înrudite. Primele trei enzime sunt digestive fiind sintetizate în pancreas și secretate în tractul digestiv sub formă inactivă de **proenzime** (zimogene). Aici, prin excizia unei porțiuni oligopeptidice se formează enzima activă. *Trombina* este o enzimă cheie în coagularea sângelui[40], *subtilisina* o protează bacteriană (din *Bacillus subtilis*). *Plasmina* scindează catenele polipetidice ale fibrinei din cheagurile formate la coagularea sângelui, iar *activatorul plasminogenului tisular* scindează plasminogenul la plasmină. O enzimă înrudită ca mecanism și structură cu serinproteazele este *acetilcolinesteraza* care scindează legătura esterică din acetil colină.

Dintre enzimele mai sus enumerate, cea mai studiată este α-chimotripsina. Structura sa a fost determinată prin studii de difracție de raze X realizate de echipa lui D.M. BLOW, iar mecanismul de reacție a fost elucidat în colaborare cu B.S. HARTLEY și J.J. BIRKTOFT. de la laboratorul de Biologie moleculară al Universității Cambridge. Numele clasei vine de la **serină**, aminoacidul cheie în mecanismul acțiunii acestor enzime. Dealtfel enzima reacționează cu ușurință cu un **inhibitor ireversibil** diizipropilfluorofosfatul (**DIP**), un compus în care fluorul poate fi deplasat cu ușurință de un nucleofil precum hidroxilul serinic (Vezi blocarea serinei la studiul situsului catalitic (*Fig. 4.20.*).

Împreună cu un rest aspartil și unul histidil, serina mai sus amintită formează așa numita triadă catalitică. Aminoacizii triadei catalitice ai α-chimotripsinei sunt: Ser195, His57 și Asp102 (*Fig.4.24.*) După cum se observă aminoacizii nu sunt apropiați în sensul structurii primare.

Reacția are loc în două etape principale:

În prima etapă se realizează o legătură covalentă între atomul de carbon C1 al legăturii peptidice ce urmează a fi hidrolizată și serina din situsul catalitic (poziția 195). Formarea intermediarului acilenzimă are loc printr-o stare de tranziție încărcată negativ la atomul de oxigen atașat de C1. Formarea acestei stări de tranziție este facilitată de rolul de bază generală al histidinei din poziția 57. Acest rol este potențat de restul de acid aspartic din poziția 102 care stabilizează sarcina parțială pozitivă care apare la nucleul imidazolic al His57. Oxigenul Ser195 devine puternic nucleofil astfel încât poate genera o stare de tranziție tetraedrică la C1. Această stare de tranziție este stabilizată prin legături de

[40] Procesul de coagulare al sângelui este realizat printr-o cascadă de reacții proteolitice în care fiecare enzimă proteolitică este inițal un zimogen activat proteolitic de o enzimă din amonte, și care la rândul său activează un zimogen în aval

hidrogen care fixează oxianionul de la C1 (intermediarul 2 – *Fig. 4.25.*). Aceste legături de hidrogen sunt realizate în așa numitul buzunar oxianionic. Ruperea legăturii peptidice duce la formarea acilenzimei (intermediarul 3).

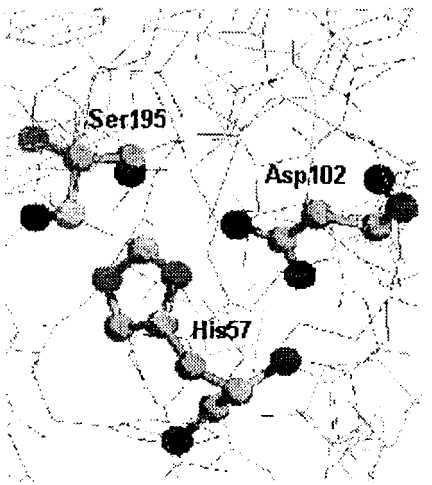


Fig. 4.24. Poziția relativă a aminoacizilor componenți ai triadei catalitice specifici serin proteazelor

În cea de-a doua etapă, sub influența aceleiași baze generale dar in prezența apei va avea loc un atac nucleofil la același C1. (starea 4). Și în cea de-a doua stare de tranziție ionul oxianionic este stabilizat prin existența unor legături de hidrogen în același buzunar oxoniu (starea 5). Prin ruperea legăturii esterice dintre serină și fragmentul peptidic N-terminal enzima se regenerează (starea 6).

Din mecanismul de funcționare al serinproteazelor explicitat pe α-chimotripsină, rezultă următoarele caracteristici:

♦ Existența triadei catalitice, Arg, His, Ser care permite hidroliza unei legături peptidice.

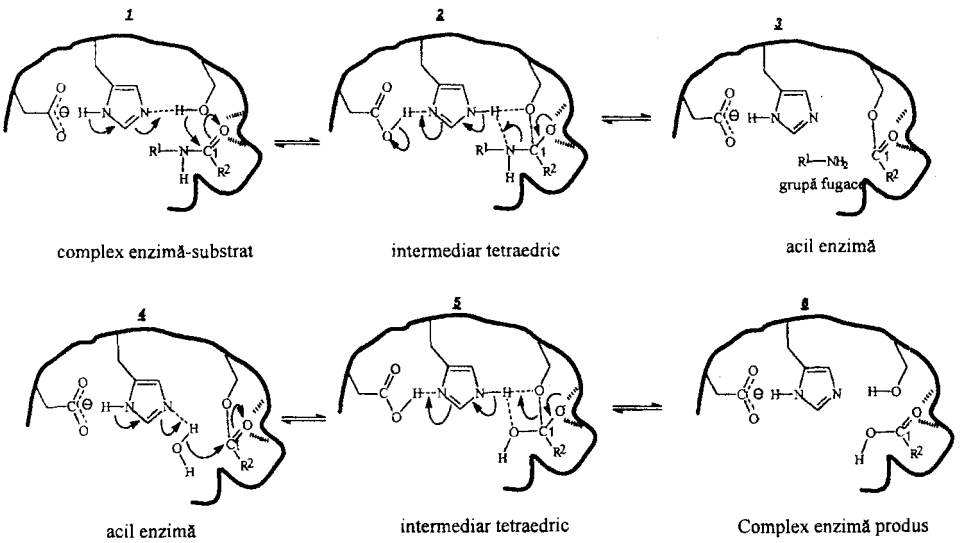


Fig.4. 25. Mecanismul proteolizei catalizate de chimotripsină

♦ Eficiența acțiunii catalitice depinde de stabilizarea celor două stări de tranziție prin legăturile de hidrogen care fixează oxianionul de la C1. Aceste legături de hidrogen presupun existența buzunarului oxianionic.

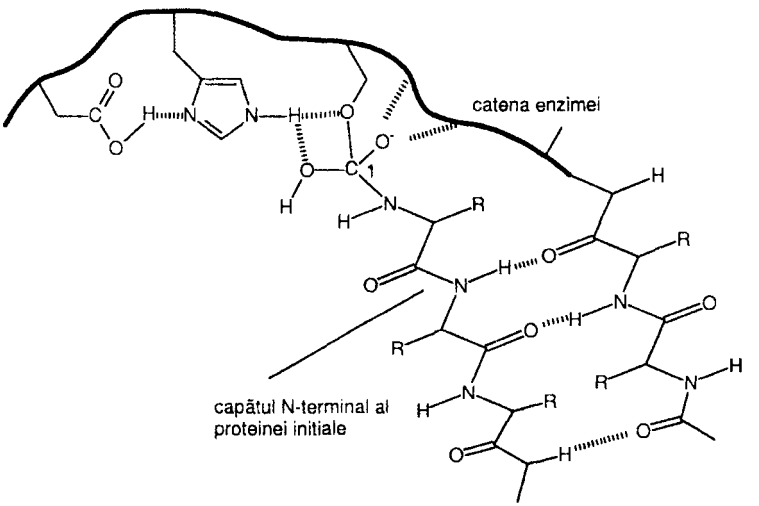
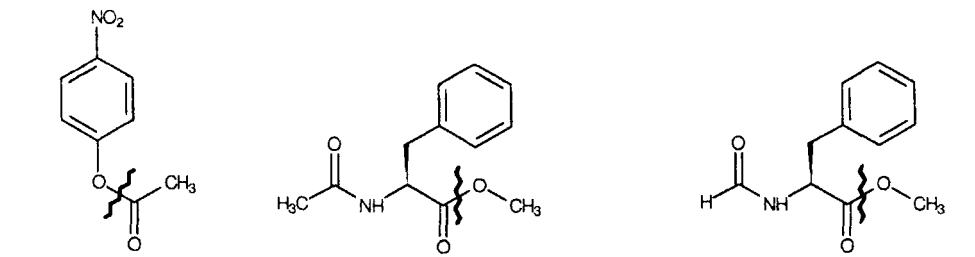


Fig. 4.26. Interacțiunea chimotripsină proteină în cazul serinproteazelor

♦ Selecția legăturii peptidice care urmează a fi hidrolizată, cu alte cuvinte specificitatea acțiunii enzimei, este dependentă de existența unui „buzunar" cu structură complementară restului de aminoacid atașat de carbonul legăturii peptidice care se va cliva. Astfel, acest rest este aromatic pentru chimotripsină, bazic pentru tripsină etc.



acetatul de 4-nitrofenil N-acetil fenilalanilatul de metil N-formil fenilalanilatul de metil

Fig.4. 27. Substraturi sintetice utilizate pentru studiul mecanismului reacției chimotripsinei

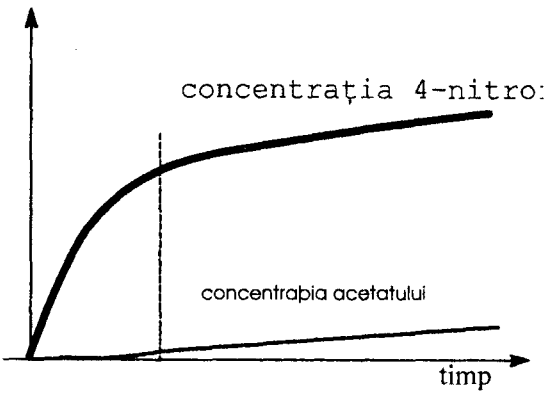


Fig. 4.28. Dinamica nitrofenolatului şi a acetatului la hidroliza chimotriptică a acetatuzlui de 4-nitrofenil

♦ In fine, porţiunea N-terminală a catenei polipeptidice imediat adiacentă situsului de clivare este fixată de enzimă prin formarea unor porţiuni beta antiparalele atât pe proteină cât şi pe enzimă În *Fig. 4.21.* se prezintă cele două modalităţi de fixare ale celor două stări de tranziţie de către serin proteaze.

Dovada experimentală a existenţei a două etape în funcţionarea serin proteazelor a fost obţinută prin utilizarea chimotripsinei ca enzimă pentru clivarea unor substraturi sintetice precum 4-nitrofenilacetatul sau N-acetil fenilalanilacetatul de metil ori N-formil fenilalanilacetatul de metil (*Fig.4.27.*). Primul dintre aceste două este mai uşor de utilizat deoarece 4-nitrofenolatul obţinut este uşor decelabil pentru ca prezintă o absorbţie intensă la 400 nm.

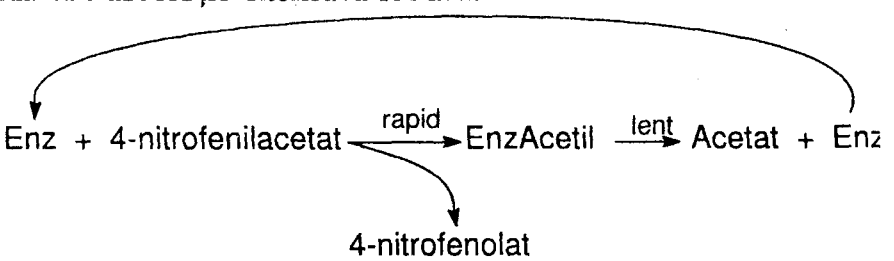


Fig. 4.29. Schema acţiunii chimotripsinei asupra 4-nitrofenolatului

Utilizând o cantitate mare de enzimă, se observă iniţial o creştere rapidă a cantităţii de 4-nitrofenolat eliberat, urmată de o reducere a vitezei de formare a acestuia, dinamica eliberării sale în această fază urmând o alură liniară, paralelă cu cea a eliberării acetatului. (*Fig. 4.28.*). Aceasta confirmă formarea rapidă a complexului enzimă substrat urmată de eliberarea treptată a acetatului din acest complex. Pe măsură

ce are loc această eliberare enzima poate atașa noi cantități de substrat, dar viteza procesului este limitată de disponibilitatea enzimei libere, disponibilitate limitată de etapa lentă a descompunerii complexului enzimă substrat. (*Fig. 4.29*)

4.4.4.2. Proteazele aspartice

Din multitudinea de enzime proteolitice o notă aparte o face o categorie caracterizată de prezența în situsul catalitic a două resturi de aspartat. De aici numele de proteaze aspartice. Aceste enzime lucrează la valori acide, cel mult neutre ale pH-ului.

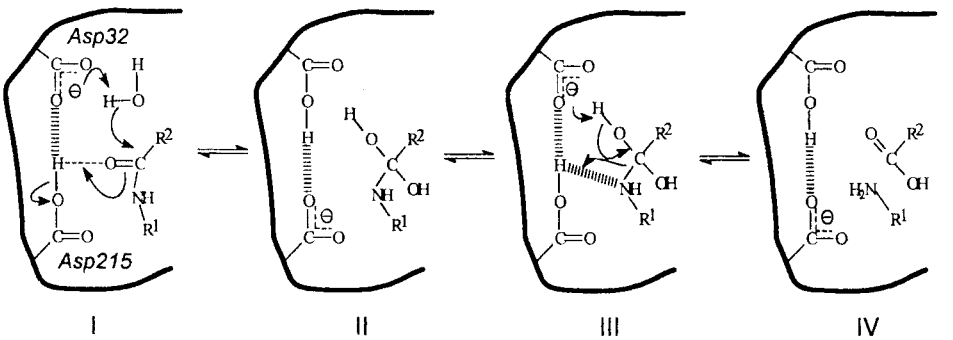


Fig. 4.30. Mecanismul general de acțiune al proteazelor aspartice

Exemple semnificative sunt: ***pepsina*** și ***chimozina***, enzime stomacale care au rolul de a digera proteinele alimentare, ***catepsina D***, identificată în mai multe țesuturi, cu rol în digestia lizozomală a proteinelor, ***renina***, enzima sintetizată în rinichi, cu rol în formarea angiotensinei I din angiotensinogen[41]. De asemenea ***proteaza HIV-1*** din virusul SIDA, care acționează asupra proteinelor virale SIDA este tot o protează aspartică.

Cele mai multe dintre proteazele aspartice au masa de cca. 350 kD ceea ce corespunde la 323 - 340 de aminoacizi. Structura proteică este organizată în două domenii. Fiecare dintre aceste două domenii conține două foi beta și două scurte alfa helixuri. Cele două domenii sunt conectate printr-o foaie beta cu șase catene antiparalele. Situsul catalitic se găsește în „adâncitura" formată între cele două domenii. Volumul său este suficient pentru a putea adăposti cca. șapte resturi de aminoacizi. Aminoacizii de contact sunt două resturi de acid aspartic de unde și numele clasei. În cazul pepsinei porcine cei doi aminoacizi de con-

[41] Acest proces stă la baza creșterii presiunii arteriale

tact sunt Asp32 și Asp215. Trebuie menționat că porțiunea N-terminală a enzimei se constituie într-un veritabil capac ce acoperă și imobilizează substratul în situsul catalitic.

Mecanismul prin care are loc clivarea legăturii peptidice este o cataliză generală acido-bazică. Cele două resturi de acid aspartic funcționează succesiv ca donori și acceptori de protoni, respectiv ca acizi sau baze generale (*Fig. 4.30.*). În etapa inițială (I) restul aspartat se comportă ca bază generală acceptând un proton de la o moleculă de apă, a cărei oxigen va dobândi o nucleofilicitate sporită, putând în acest mod să atace carbonul legăturii peptidice poziționată în situsul catalitic. Prin preluarea de către oxianionul tetraedric a protonului de la restul de acid aspartic 215, se va forma o amidă hidrat instabilă (II), care se va descompune prin atacul bazic al Asp32, odată cu ruperea legăturii C-N (III) și formarea resturilor carboxil și amino ale capetelor N și C terminale nou formate prin ruperea legăturii peptidice.

4.4.4.3. Lizozimul

Este o enzimă detectată prima dată, în albușul oului de găină, de către LASTCENKO în 1909 și apoi în 1922, în mucus și lacrimi, de către FLEMING, descoperitorul de mai târziu al penicilinei, Numele derivă de la capacitatea acestei substanțe de a ***liz***a peretele unor bacterii. Substanța este de natură en***zim***atică.

Așa după cum s-a arătat, peretele peptidoglicanic al bacteriilor constă dintr-o multitudine de catene poliglucidice, fiecare fiind formată dintr-o unitate diglucidică repetitivă. Catenele sunt reticulate între ele prin scurte catene oligopeptidice. Unitatea diglucidică este formată din acid N-acetil muramic –**NAM**- (vezi aminoglucide), de care se găsește atașat amidic catena oligopeptidică și N-acetilglucozamină –**NAG**-.

Lizozimul este o endoglucozidază care are capacitatea de a rupe legăturile glicozidice dintre NAM și NAG din peptidoglicani (vezi *Fig. 4.31*) sau legăturile gicozidice dintre unitățile de NAG ale chitinei. S-a constatat că substraturile cele mai potrivite pentru enzimă, pentru care se ating vitezele maxime sunt trimerul (NAM-NAG)3, și hexa-Nacetilglucozamina $(NAG)_6$-chitohexoza.

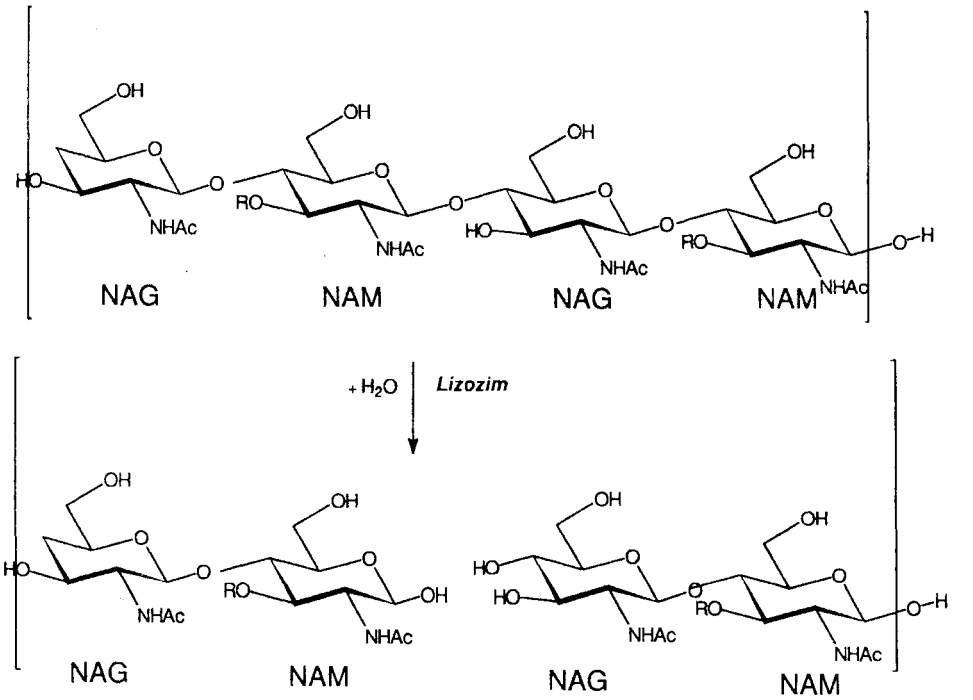


Fig. 4.31. Locul acțiunii lizozimului asupra componentei poliglucidice din peptidoglicanul peretelui bacterian

Enzima are o dimensiune mică, fiind formată din 129 de aminoacizi. Este de altfel prima enzimă căreia i s-a determinat structura prin difracție de raze X (în 1965 de către echipa condusă de David PHILLIPS). Mecanismul de acțiune și structura situsului catalitic au fost posibile după mai multe determinări structurale ale complexelor enzimă inhibitori competitivi (analogi de substrat), realizate pe un set de oligogluci-de. Aceasta, deoarece complexul enzimă substrat are o durată de viață prea scurtă pentru a putea fi studiat. Cele mai bogate în informații s-au dovedit datele relevate prin folosirea trimerului $(NAG)_3$. Față de substratul clasic viteza reacției de hidroliză este de cca. 60.000 de ori mai scăzută.

S-a constatat că enzima are șase subsitusuri în care leagă necovalent o secvență de șase glucide (A-F). În urma rezultatelor obținute de echipa lui PHILLIPS s-a propus un mecanism de reacție, neinfirmat până în prezent,

În vecinătatea legăturii care urmează să fie clivată se găsește Asp–52 și Glu–35, (două resturi acide).

Legătura care va fi clivată se găsește între subsitusurile D și E. Din acest motiv trimerii $(NAG)_3$ sau NAG-NAM-NAG se comportă ca veritabili inhibitori.

În subsitusul D, glucida atașată va suferi o modificare conformațională care la o structură de tip plic sau semibarcă (structura B), *Fig. 4.32.*

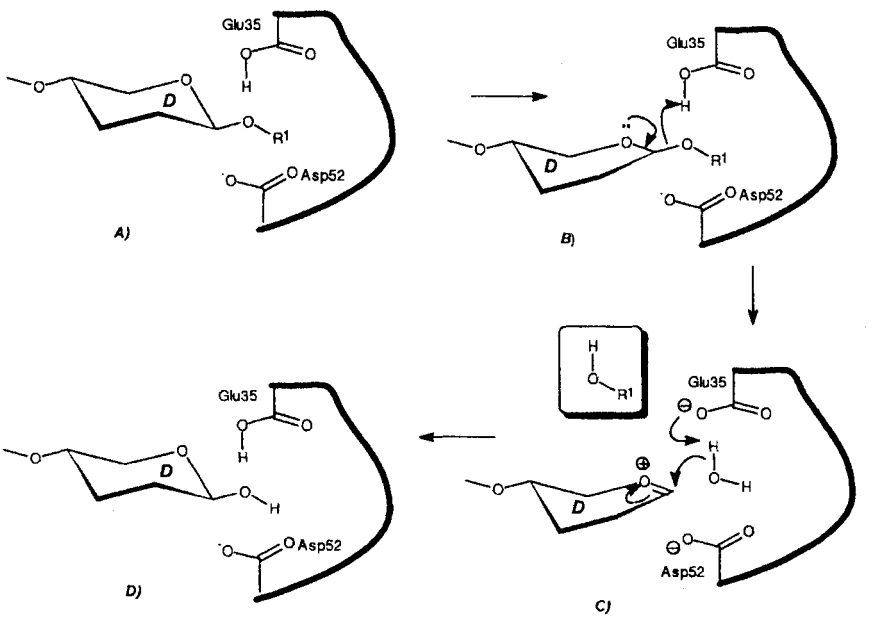


Fig. 4.32. Mecanismul acțiunii lizozimului

În cataliză acidă realizată prin participarea restului Glu35 are loc ruperea legăturii O-glicozidice a nucleului D, expulzarea fragmentului dinspre capătul reducător inițial și formarea unui ion oxocarboniu, stabilizat prin participarea celuilalt rest acid Asp52.

Gruparea carboxilat a restului Glu35 acționează în continuare ca o bază generală preluând protonul din apă, care astfel va putea ataca structura oxocarboniu, formând gruparea OH (reducătoare) a celui deal doilea fragment.

4.4.4. Cofactori enzimatici și vitamine

Tipurile de reacții chimice catalizate de către proteinele pure sunt limitate la posibilitățile de interacțiune cu substraturile ale grupelor funcționale prezente în catenele laterale ale aminoacizilor: imidazolul din histidină, carboxilul din acidul glutamic și aspartic, amino din lisină, guanidină din arginină, hidroxil din serină, treonină, tirosină, sulf-

hidril din cisteină. Aceste grupări pot funcționa fie ca acizi sau baze generale în transferul de protoni, fie în calitate de catalizatori nucleofili in cazul transferului de grupe funcționale. Gama de interacțiuni poate fi lărgită prin participarea la actul catalitic a unor componente neproteice numite ***cofactori*** sau după caz *coenzime* respectiv *grupări prostetice.* Componenta proteică a unei enzime care conține cofactori poartă numele de **apoenzimă.**

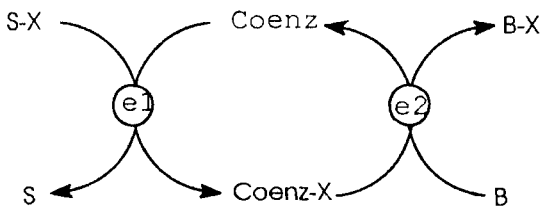


Fig.4. 33. Participarea cofactorilor de natură coenzimatică la procesul catalitic

Distincția dintre coenzime și grupări prostetice, o reprezintă tăria legării cofactorului de componenta proteică pe de o parte și participarea sau nu a unei a doua enzime sau echipament enzimatic la regenerarea cofactorului. În acest context, **coenzimele**, sunt substanțe neproteice, legate necovalent, deci separabile de apoenzimă prin dializă sau adsorbție pe cărbune activ. Ele se modifică în urma actului catalitic care transformă substratul inițial. Regenerarea lor se face de cele mai multe ori prin intermediul unei alte enzime pentru care coenzima modificată devine substrat, iar coenzima regenerată produs. În *Fig. 4.33.* se reprezintă o reacție de transfer la care participă o coenzimă (Coenz). Prima enzimă (e1) catalizează reacția principală de modificare a substratului, în timp ce enzima a doua (e2) asigură regenerarea coenzimei.

Grupările prostetice sunt de regulă legate covalent de apoenzimă. Regenerarea lor se face cu ajutorul unui substrat secundar, la reacția respectivă participând doar o singură enzimă. *Fig.4.34.*

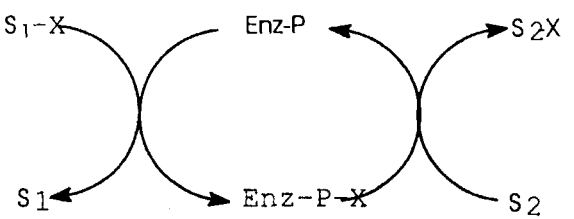


Fig.4. 34. Cofactori de tip grupare prostetică

Mulţi dintre aceşti cofactori sunt formaţi prin modificarea unor substanţe organice **esenţiale** (care nu pot fi biosintetizate de către om respectiv şobolan), numite vitamine. Acest termen a fost introdus în 1911 în legătură cu tiamina, prima vitamină izolată. Ulterior s-a demonstrat că gruparea aminică nu este obligatorie pentru această clasă, dar termenul s-a păstrat. Trebuie arătat că nu toate vitaminele pot conduce obligatoriu la cofactori enzimatici. Caracteristica lor principală este că sunt substanţe esenţiale şi că participă la reglarea unor procese metabolice sau fiziologice (oricum biochimice) cu sau fără participarea unor enzime legate.

Vitaminele se pot sistematiza în două mari clase vitamine hidrosolubile şi vitamine liposolubile. Pe lângă vitamine se mai cunosc substanţe cu aceeaşi funcţie, dar care pot fi biosintetizate limitat de către organismul uman respectiv de şoarece. Ele sunt cunoscute sub numele de **substanţe asemănătoare vitaminelor** (vitamin-like substances).

În *Tab. 4.3.* se prezintă vitaminele şi substanţele asemănătoare vitaminelor

Tab. 4.3. Principalele vitamine şi funcţiile acestora

Substanţa	*Funcţia*
	Vitamine hidrosolubile
Tiamina (B_1)	Precursor al coenzimei tiaminpirofosfat. Deficienţa poate genera beriberi
Riboflavina (B_2)	Precursor al coenzimelor flavinadeninmononucleotidă (FMN) şi flavinadenindinucleotida (FAD). Deficienţa poate cauza întârzieri ale creşterii.
Biotina	Precursor al coenzimei biocitina
Piridoxina (B_6)	Precursor al coenzimei piridoxal fosfat. Deficienţa poate cauza dermatite la şoareci.
Acidul nicotinic (Niacina)	Precursor al coenzimelor nicotinamidadenin-dinucleotida (NAD) şi nicotinamidadenindinucleotid-fosfat (NADP). Deficienţa poate cauza pelagra.
Acidul pantotenic	Precusor al coenzimei A (CoA). Deficienţa poate conduce la dermatite la păsări.
Acidul folic	Precursor al coenzimei acid tetrahidrofolic. Deficienţa conduce la anemii.
Vitamina B_{12}	Precursor al coenzimei deoxiadenozil cobamida. Deficienţa conduce la anemia pernicioasă.
Vitamina C	Cosubstrat în hidroxilarea prolinei la colagen. Antioxidant. Deficienţa conduce la scorbut.
	Vitamine liposolubile
Vitamina A	Are rol în vedere, creştere şi reproducere.
Vitamina D	Reglarea metabolismului calciului şi fosforului
Vitamina E	Factor antisterilitate
Vitamina K	Factor de coagulare
	Substanţe asemănătoare vitaminelor
Inositolul	Mediator în acţiunea hormonală
Colina	Constituent al lipidelor membranare, factor de transport al lipidelor
Camitina	Substanţă necesară transportului acizilor graşi în mitocondrie
Acidul a-lipoic	Coenzimă în decarboxilarea oxidativă a cetoacizilor
Acidul 4-aminobenzoic	Component al acidului folic
Coenzima Q (ubichinonele)	Componentă importantă în transportul mitocondrial al electronilor

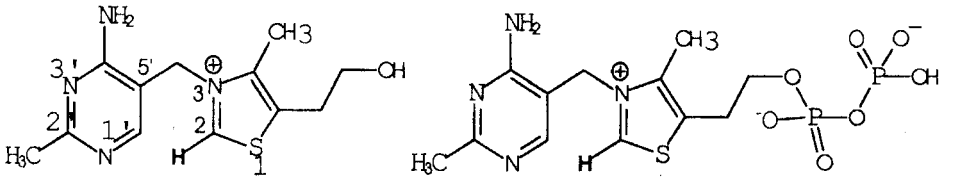


Fig.4.35. Vitamina B1 și tiaminpirofosfatul

4.4.4.1. Vitaminele hidrosolubile și coenzimele lor

4.4.4.1.1. Vitamina B_1 (Tiamina sau aneurina)

Are o structură care include două heterocicluri: un nucleu pirimidinic și unul tiazolic (*Fig. 4.35.*). Atomul de azot al heterociclului tiazolic nu posedă perechea de electroni, neparticipanți de aceea molecula apare sub formă cationică. Prezența sarcinii pozitive, labilizează legătura C-H heterociclică adiacentă, de aceea chiar sub influența unei baze relativ slabe, protonul se va elimina carbonul devenind astfel un bun nucleofil. Coenzima derivată de la tiamină este tiamin pirofosfatul (*Fig.4.35.*)

Prin legarea restului pirofosfat, pe de o parte se mărește aciditatea compusului, datorită efectelor electronacceptoare ale restului pirofosfat, iar pe de altă parte, restul pirofosfat, permite interacțiuni puternice cu porțiunile cationice ale componentei proteice ale enzimei.

Tiamin pirofosfatul intră în componența unor enzime care scindează legături de tipul prezentat în *Fig. 4.36.* prin covalență îngroșată:

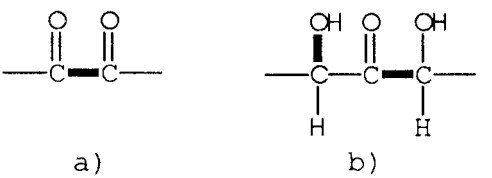


Fig.4.36. legături care pot fi scindate prin intervenția cofactorilor TPP

Structurile de tip a) caracteristice α-cetoacizilor fac obiectul reacțiilor de decarboxilare (piruvat decarboxilaza, α–cetoglutarat decarboxilaza etc).

Structurilor de tip b) le sunt caracteristice reacțiile catalizate de *transcetolază* respectiv *fosfocetolază.*

Un exemplu interesant al acțiunii tiaminpirofosfatului este acela al transformărilor acidului piruvic în produși și intermediari precum acetoina, acetolactatul, acetaldehida, acetatul și acetilfosfatul *Fig.4.37.* Aceste transformări au în comun adiția directă a carbocationul nucleului tiazolic la piruvat. Intermediarul format se decarboxilează formând un nou intermediar, stabilizat prin rezonanță, care poate la rândul său, prin intermediul carbonului exociclic, cu mare densitate de electroni să dea reacții de adiție nucleofilă la acetaldehidă, sau la piruvat, cu formarea unor compuși tetraedrici instabili datorită apropierii de azotul cationic. Aceștia, datorită deplasărilor electronice vor suferi clivarea legăturii carbon-carbon formate prin adiția anterioară, regenerând coenzima și formând respectiv acetoina și acetolactatul, compuși identificați mai ales în fermentațiile anaerobe bacteriene sau produse de drojdii, unde concentrația de acid piruvic este ridicată. De asemenea produsul de adiție-decarboxilare al TPP-ului poate să capteze din mediu un proton. Prin ruperea legăturii carbon - carbon se formează acetaldehidă. O altă posibilitate este pierderea protonului hidroxilic și formarea în consecință a unui carbon trigonal. Acest compus prin hidroliză sau fosforoliză va forma acetatul sau acetil fosfatul. Transcetolaza este de asemenea o enzimă TPP-dependentă. O întâlnim în calea pentozofosfaților, în fotosinteză – vezi Vol. II. Mecanismul transferului motivului hidroxiacetil este prezentat în *Fig. 4.38.*

4.4.4.1.2. Vitamina B2 (Riboflavina)

Numele îi vine de la latinescul flavius („galben") - culoarea formei oxidate a substanței.

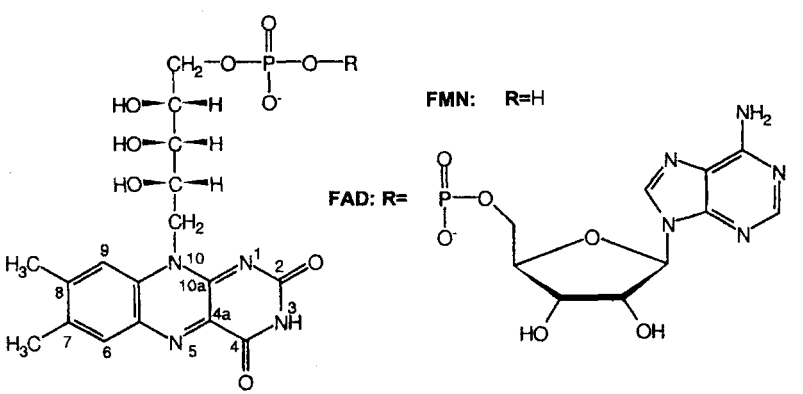


Fig. 4.37. Cofactorii flavinici (FAD și FMN)

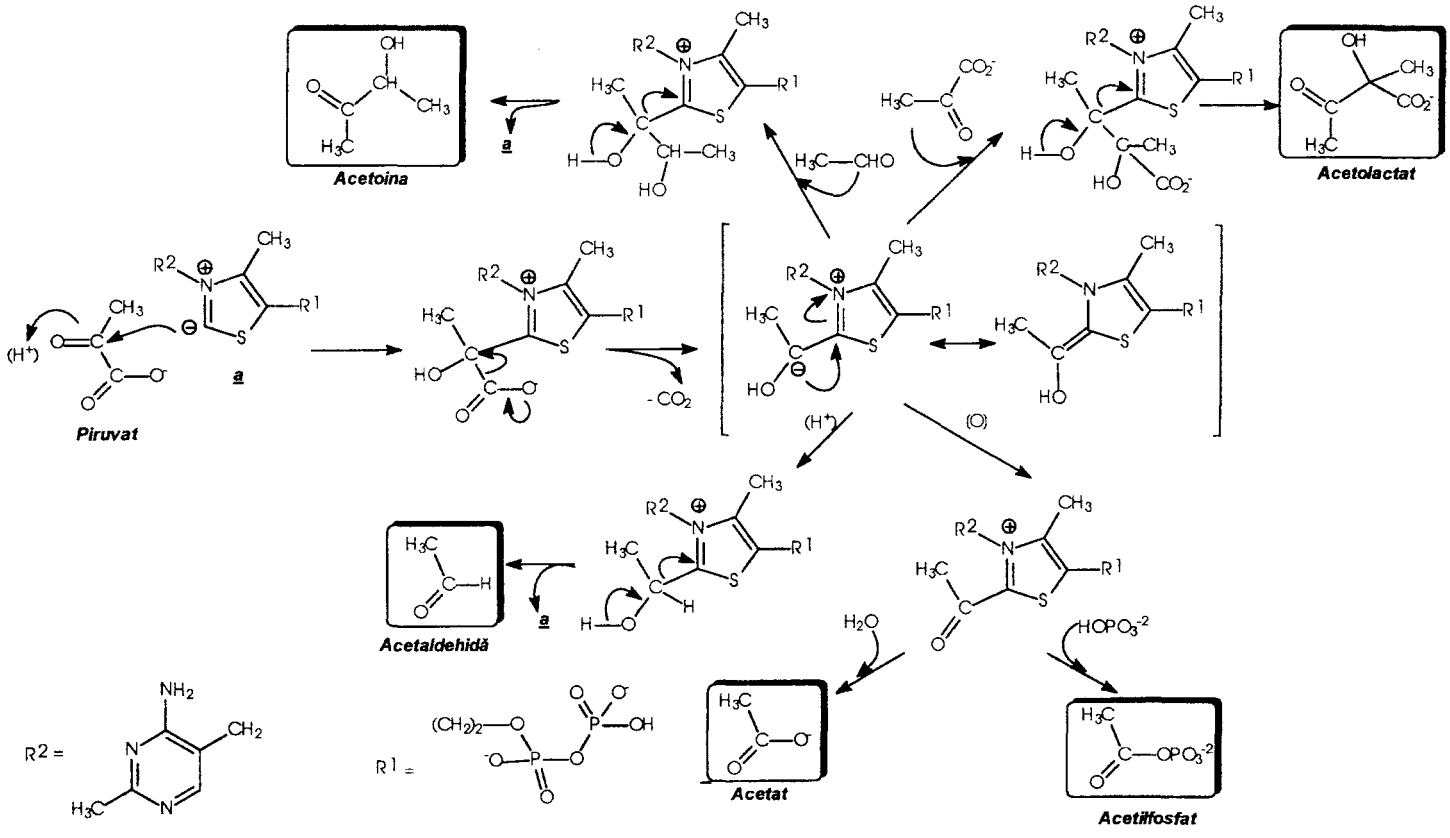


Fig.4.38. Modalități de transformare ale piruvatului sub influența enzimelor

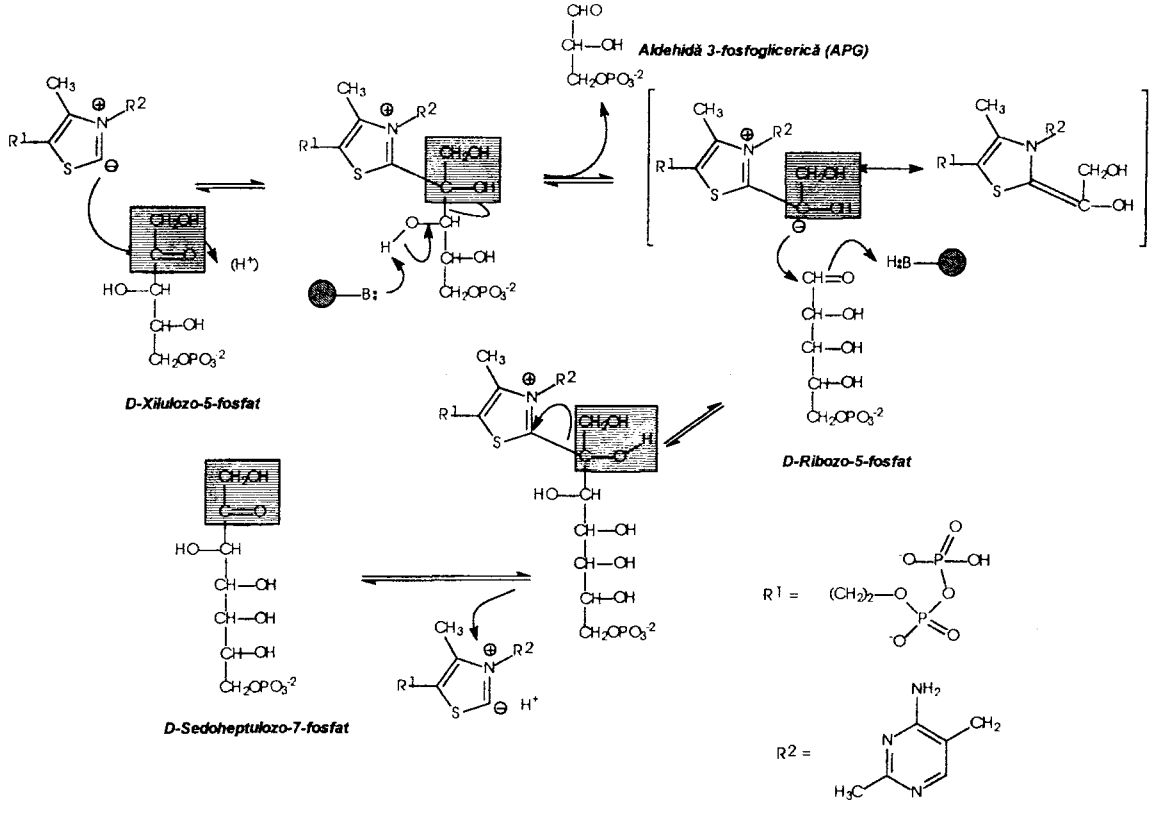


Fig.4.39. Mecanismul acțiunii transcetolazei

Cofactorii flavinici participă la lanțul transportor de electroni și totodată intră în componența unor oxidoreductaze precum succiniatdehidrogenaza (E.C.1.3.99.1). Cofactorul flavoproteinelor este fie ***flavinmononucleotida***, (*FMN*) fie ***flavinadenindinucleotida***, (*FAD*), ale căror structuri sunt redate în *Fig. 4.39.* Ambele conțin în structura lor restul de **riboflavină** care constă în 7,8 dimetilizoaloxazină legată în poziția 10 cu carbonul 1' al D-ribitolului. Această legătură nu este glicozidică de aceea numele de flavinmononucleotidă, respectiv flavinadenindinucleotidă sunt incorecte. Se acceptă totuși datorită intrării lor în uzul curent al literaturii biochimice.

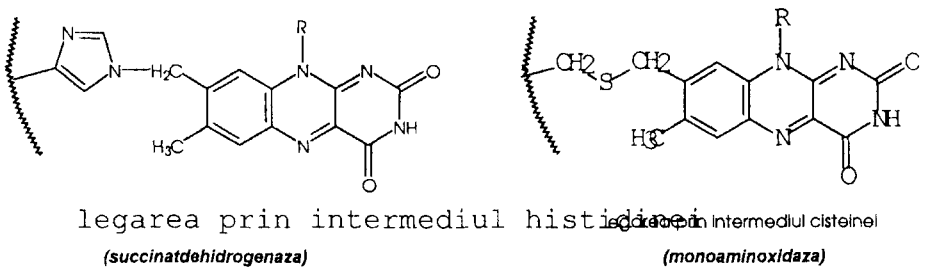


Fig.4.40. Atașarea covalentă a unor grupări prostetice flavinice

Majoritatea flavoproteinelor conțin FAD, iar cofactorul este de natură coenzimatică, putând fi astfel îndepărtat prin dializă. Se cunosc însă și excepții cum ar fi succinat dehidrogenaza, în care legarea cu componenta proteică are loc covalent prin intermediul unui rest de histidină din catena polipeptidică și monoaminoxidaza legată la componenta proteică printr-o legătură tioeterică (*Fig. 4.40.*)

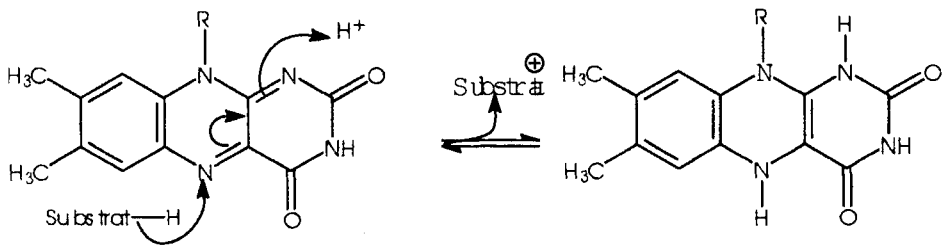


Fig.4. 41. Mecanismul ionic al reducerii / oxidării nucleului izoaloxazinic

Porțiunea funcțională a FAD, respectiv FMN constă în prezența celor două nuclee azotate din structura izoaloxazinică. Este acceptat mecanismul conform căruia, în timpul reducerii, atomii de azot 1 și 5 pri-

mesc câte un echivalent de electroni şi protoni. În prima etapă un ion hidrură, care provine de la substrat (de exemplu de la NADH) atacă atomul de azot din poziţia 5. (*Fig. 4.41.*) După rearanjările electronice consecutive, nucleul se stabilizează prin captarea unui proton din mediu, la atomul de azot din poziţia 1.

Global, structura primeşte doi protoni şi doi electroni. Prin modificarea sistemului de duble legături, formele oxidată, respectiv redusă au maxime de absorbţie specifice în ultraviolet, şi vizibil ceea ce permite identificarea şi cuantificarea acestora (*Fig. 4.42.*)

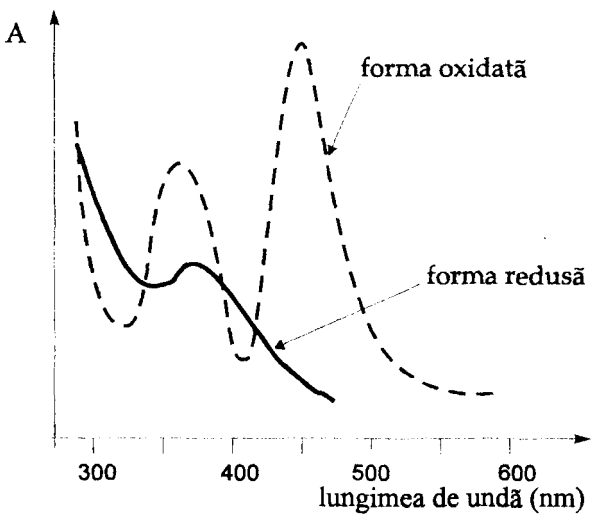


Fig. 4.42. Alura spectrelor UV.VIS a formelor redusă şi oxidată a flavinelor

Potenţialul de reducere al FAD şi FMN este de - 0.219 V la pH = 7 şi t = 30 °C. În flavoproteine, datorită interacţiunii cu apoenzima valoarea acestuia suferă deplasări semnificative, cel mai adesea către valori pozitive. Asociaţiile coenzimelor flavinice cu diferite proteine fac din flavoproteine o familie de substanţe cu potenţiale diferite capabile să funcţioneze cu o varietate mare de acceptori de protoni.

Coenzimele flavinice posedă şi fluorescenţă dar, din păcate această proprietate nu poate fi utilizată în determinări analitice datorită „stingerii" provocate de apoenzimă.

Nucleul izoaloxazinic poate fi identificat şi sub forma unor structuri semichinonice, radicalice rezultate în urma transferului unui singur proton respectiv unui singur electron:

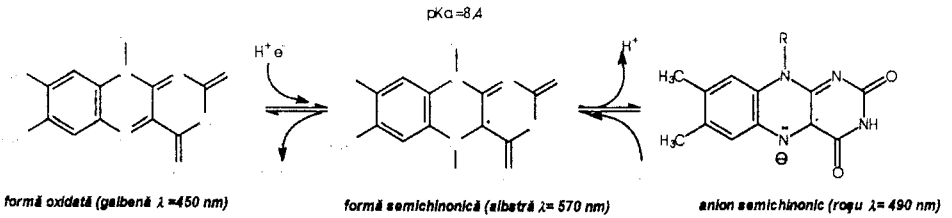


Fig.4. 43. Punerea în evidență a intermediarului radicalic la oxidoreducerea flavinelor

Forma redusă a flavoproteinelor ($FMNH_2$ sau $FADH_2$) are o afinitate deosebită pentru oxigen putând forma în reacția directă cu acesta un hidroperoxid (*Fig.4.44*):

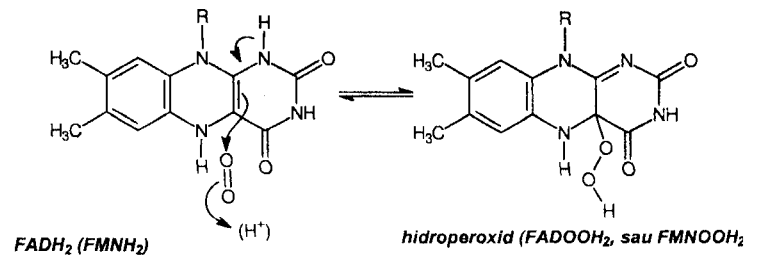


Fig.4.44. Reacția formelor reduse ale flavinelor cu oxigenul

Acest hidroperoxid este deosebit de reactiv, având posibilitatea de a se descompune, cu formare de apă oxigenată respectiv de flavină oxidată (*Fig.4.45*):

Datorită acestui comportament complex flavinproteinele pot fi:

A. **dehidrogenaze**, atunci când oxigenul nu este redus de către nucleul ixoaloxazinic.

B. **oxigenaze**, când preiau hidrogenul de pe substrat și îl transferă pe oxigen cu formarea de apă oxigenată, aceasta descompunându-se ulterior sub acțiunea catalazelor sau fiind utilizată de către peroxidaze.

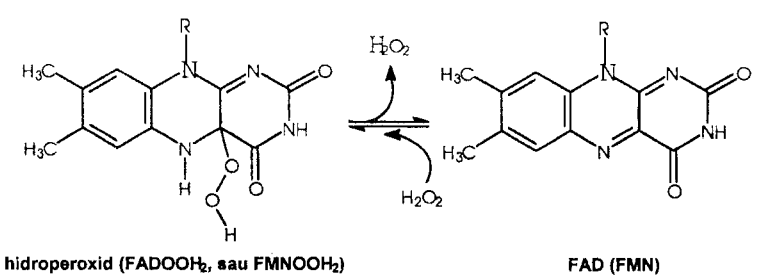


Fig.4.45. Descompunerea hidroperoxidului flavinic

C. transportoare de electroni precum **flavodoxinele**

Acțiunea *dehidrogenazelor flavinice* se exercită în special:

1. asupra legăturilor **carbon – carbon.** De exemplu succinat dehidrogenaza formează prin acidul fumaric prin oxidarea (dehidrogenarea) acidului succinic.
2. asupra legăturilor CH-OH cu ar fi oxidarea membranară a lactatului în piruvat sau în oxidarea membranară a 3-fosfogliceratului. In general aceste oxidări membranare se realizează cu enzime flavinice interpuse.
3. asupra legăturii C-H precum **oxidarea membranară a NADH, H^+:** complexul NADH dehidrogenază conține FMN precum și centrii Fe-S și canalizează electronii către o chinonă respiratorie (ubichinona).
4. ca **reductaze.** Flavinenzimele capabile să reducă citocromii sau proteinele cu fier - sulf sunt exemple tipice. Multe dintre aceste enzime utilizează ca surse de electroni NADH sau NADPH sau glutationul redus. Altele primesc electroni din alte surse. Astfel de reductaze cedează de regulă secvențial cei doi electoni primiți, putându-se astfel identifica intermendiari radicalici semichinonici, expulzând în mediu protonii.
5. ca **oxidaze** în care acceptorul de electroni al formelor reduse este oxigenul diatomic. Oxidazele intervin în oxidarea mai multor substraturi: aminoacizi, amine, glucoza etc. De remarcat că în cazul acestor enzime oxigenul introdus în molecula substratului provine din apă. Reducerea oxigenului diatomic reprezintă doar faza de regenerare a formei oxidate a acestor flavoenzime.

Notând substratul cu AH_2 oxidazele acționează prin transferul simultan al celor doi electroni, cu eliberarea de apă oxigenată sau transferul secvențial a doi electroni cu formarea ionului-radical *superoxid* $O_2^{\bullet -}$. Acest ultim caz este exemplificat prin *xantinoxidază*. Ionul radical, toxic, este inactivat de către superoxid dismutază, o cupruenzimă care face posibilă reacția:

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Un exemplu de **acțiune oxidazică**, este prezentat în *Fig. 4.46.* În acest caz D-aminoacizii se transformă în α-cetoacizi prin intermediul *D-aminoacidoxidazei*, o enzimă larg răspândită în lumea animală. Mecanismul propus a fost verificat folosind ca substrat nitroetanul, un compus care în mediu bazic formează un carbanion stabil câteva ore la pH=7.

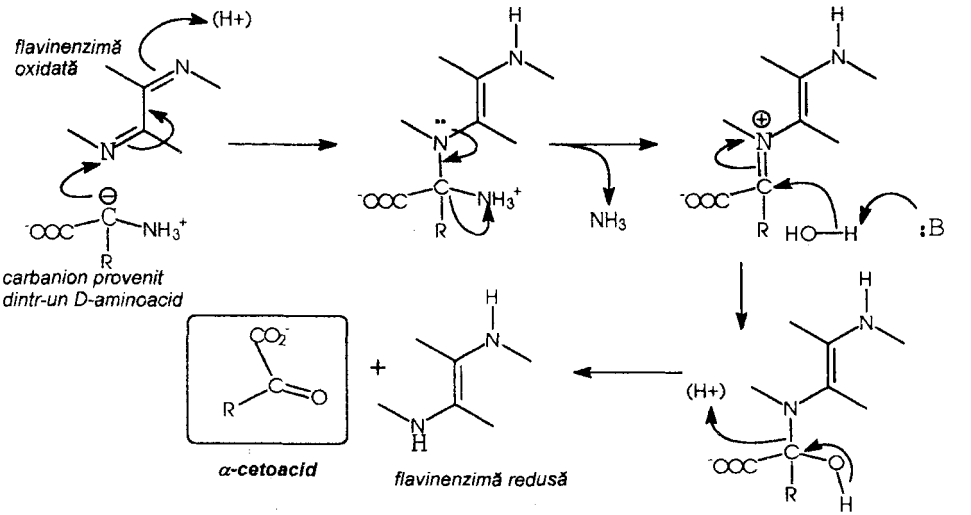


Fig.4.46. oxidarea aminoacizilor de către flavinoxidaze

Reamintim faptul că oxigenul introdus în structura substratului de către formele oxidazice ale flavoproteinelor provine de la apă, flavina redusă putându-se reoxida fie anaerob fie aerob.

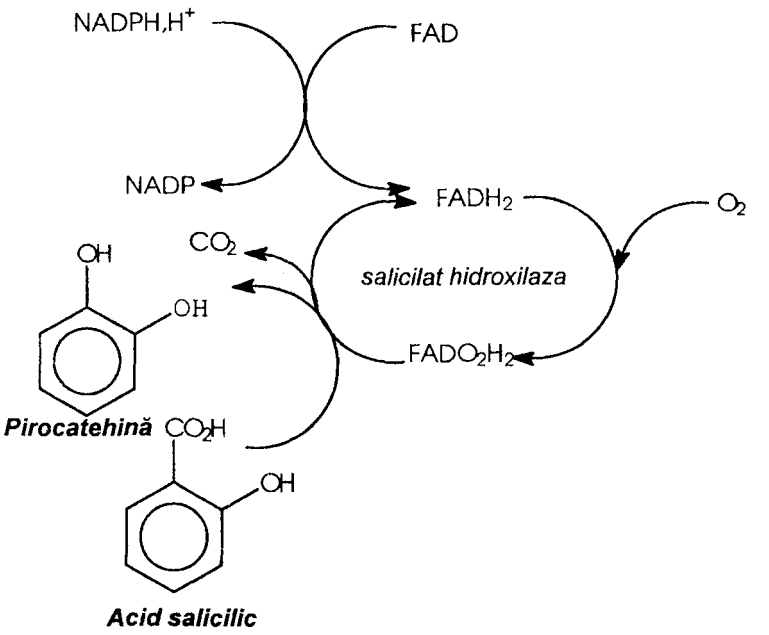


Fig. 4.47. Oxidarea fenolilor sub acțiunea unor oxidaze flavinice

Monoxigenazele flavinice sunt enzime capabile să introducă un atom de oxigen în structura unui anume substrat. Majoritatea monooxigenazelor din această clasă sunt FAD-enzime. Exemple tipice sunt *4-hidroxibenzoat hidroxilaza* din diferite specii bacteriene precum *Pseudomonas, Azotobacter, Acinetobacter.* De asemenea se poate aminti *salicilathidroxilaza* din *Pseudomonas.* Numele de hidroxilaze vine de la faptul că ele realizează intercalarea atomului de oxigen între un atom de carbon şi unul de hidrogen.

Caracteristic acestor enzime este că ele acţionează sub formă redusă ($FADH_2$), obţinută prin oxidarea NADPH, mai rar a NAD. Ele activează oxigenul prin formarea structurii 4a-hidroperoxidice. Această structură va suferi o clivare heterolitică la nivelul legăturii peroxidice, sub asistenţa unui proton din mediu, formând apă. Oxigenul de pe structura flavinică, cu deficit de electroni, deci foarte oxidant, va fi smuls de către substrat care îl va încorpora.

Importanţa coenzimelor flavinice constă în capacitatea acestora de a cataliza o varietate mare de procese redox, incluzând transferul de electroni dar şi activarea oxigenului in procesele de oxigenare.

Un alt exemplu interesant îl constiuie acţiunea *ciclohexanonoxigenazei* bacteriene, o enzimă care mediază transformarea cetonelor ciclice în lactone cu ciclu incrementat. În acest caz hidroperoxidul flavinic, atacă nucleofil carbonul carbonilic, intermediarul obţinut suferind o transpoziţie Baeyer-Villiger. (*Fig.4.48.*)

Acţiunea lor constituie punctul de intersecţie a căilor citosolice de metabolizare a carbonului, iniţiale, care implică transferuri bielectronice, cu căile finale, asociate membranelor care sunt predominant monoelectrontransferazice.

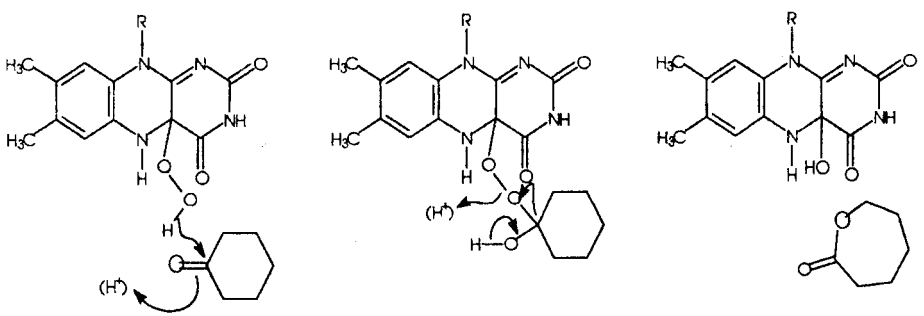
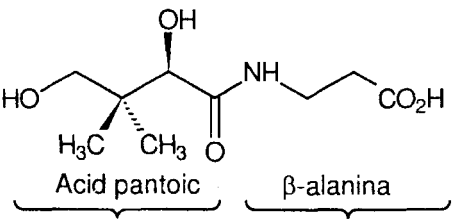


Fig.4.48. Acţiunea ciclohexanonoxidazei

În celulele mamiferelor, metabolizarea glucozei (vezi metabolismul glucidelor) duce la formarea de CO_2 și NADH. Calea terminală de transfer de electroni, legată de membrană include citocromii, proteinele ferice neheminice precum și cuproproteinele, toate acționând succesiv, prin transfer monoelectronic până la acceptorul final oxigenul, cu formare de apă din protoni și oxigen astfel redus, NAD^+, concomitent cu înmagazinarea unei mari cantități de energie sub formă de acid adenozintrifosforic format din ADP și fosfat.

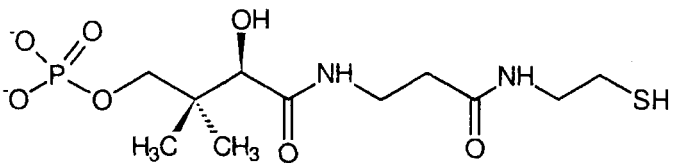
4.4.4.1.3. Vitamina B5 (Acidul pantotenic)



Acidul pantotenic

Fig.4.49.

Denumirea, de origine greacă sugerează larga răspândire a acestui compus, în fapt amida acidului pantoic cu β-alanina (*Fig. 4.49.*). Acidul pantotenic natural, existent în enantiomerul R, se absoarbe la nivel intestinal și din acesta derivă doi cofactori enzimatici: **fosfopanteteina** și **coenzima A.** Ambii se obțin dintr-un intermediar comun rezultat prin fosforilarea hidroxilului terminal al acidului pantoic.

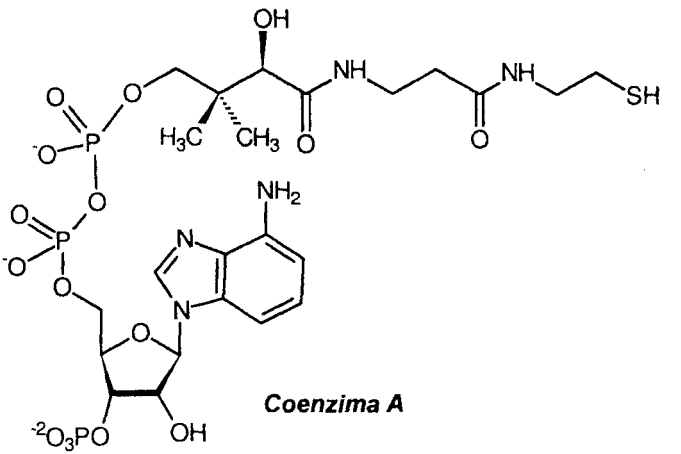


fosfopanteteina

Fig.4.50.

Fosfopanteteina (*Fig.4.50.*), este prezentă în anabolismul acizilor grași unde legată de o componentă proteică formează *proteina transportoare de acil* (ACP - Acil Carrier Protein) care are rolul de suport al sintezei catenei de acid gras (vezi metabolismul acizilor grași Vol. II.).

Fosfopanteteina conține legat amidic de carboxil 2-aminoetantiol, iar de capătul OH terminal un rest fosfat. Prin restul fosfat al fosfopanteteinei se face joncțiunea cu o catenă polipeptidică care conține 77 de resturi de aminoacizi rezultând astfel complexul ACP.



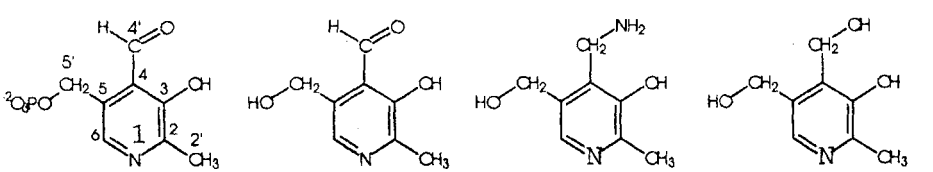
Coenzima A

Fig.4.51.

Cel de-al doilea produs bioactiv la care participă acidul pantotenic este coenzima A (*Fig.4.46.*) Structura coenzimei A conține fosfopanteteină atașată fosforanhidridic de acidul adenilic (vezi nucleotidele), fosforilat în poziția 3'. Rolul coenzimei A este de a fixa prin acilare la sulful tiolic diferiți acizi. Legătura tiolesterică formată este macroergică, astfel încât hidroliza acesteia, cu regenerarea acidului, respectiv a coenzimei A, putând furniza energie.

4.4.4.1.4. Vitamina B6 (Piridoxalfosfatul)

este coenzima care derivă de la vitamina B_6. În natură, aceasta este prezentă în trei forme: piridoxal, piridoxamină și piridoxină (piridoxol) *Fig. 4.52*:



Piridoxal fosfat ***Piridoxal*** ***Piridoxamină*** ***Piridoxină (piridoxol)***

Fig.4.52. Formale vitaminei B6 precum și piridoxalfosfatul derivat

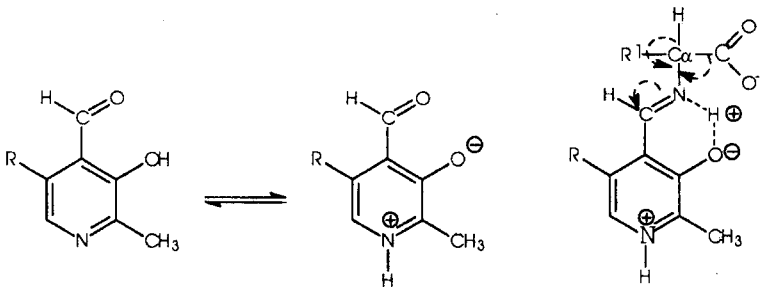


Fig.4.53. Mecanismul interacțiunii piridoxalfosfatului cu aminoacizii

Intră în componența unor enzime care „procesează aminoacizi" realizând reacții de transaminare, α-decarboxilare, racemizare, aldolizare și β-decarbozilare în cazul acidului aspartic.

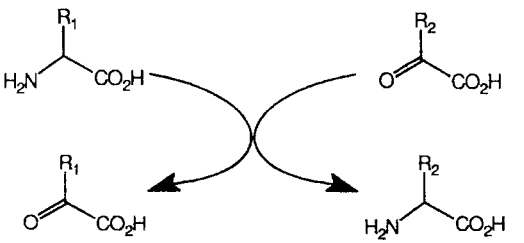


Fig.4.54. Mecanismul acțiunii transaminazelor

Aceste reacții sunt posibile datorită structurii piridoxal fosfatului de a forma imine (baze Schiff[42]) stabilizate intern, care pot la rândul lor, prin existența centrilor atrăgători din structură, să stabilizeze perechile de electroni rezultate prin clivarea heterolitică a unor legături adiacente (α sau β cel mai adesea).

Hidrogenul hidroxilic din poziția 3 se poate deplasa în poziția 1. În acest mod se creează posibilitatea stabilizării iminei prin legături de hidrogen, și totodată apare un centru suplimentar atrăgător de electroni (N^+) – *Fig.4.54.*

Transaminazele sau aminotranferazele catalizează reacția de dublu schimb formând dintr-o pereche aminoacid$_1$: α-cetoacid$_2$ o nouă pereche: aminoacid$_2$ α-cetoacid$_1$ (*Fig.4.54*):

[42] Termenul de bază Schiff se folosește de regulă pentru iminele la care amina de proveniență este aromatică.

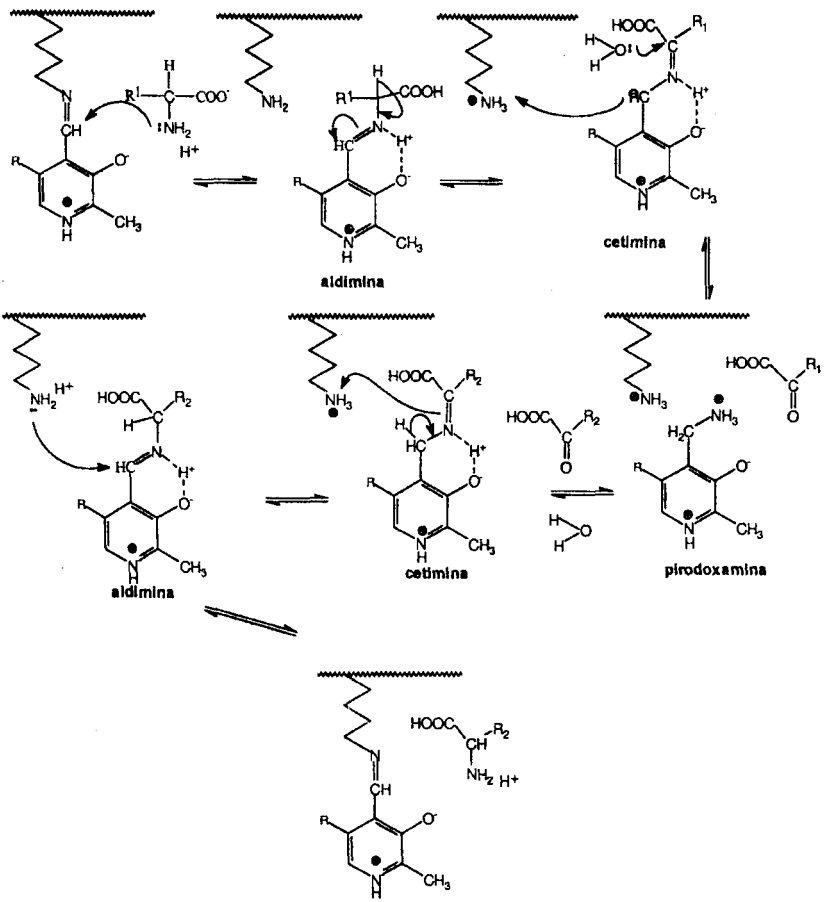


Fig.4.55. Mecanismul reacției de transaminare

Atacul asupra legăturii aldiminice se realizează prin intermediul formei deprotonate a aminoacidului reactant. Acesta va substitui lisina cu sine însuși, formându-se în acest mod o nouă aldimină. Mecanismul este prezentat în *Fig.4.55.*

Protonul inițial al aminoacidului va fi stabilizat între gruparea fenoxid din poziția 2 a moleculei de piridoxalfosfat și azotul aldiminic. Formarea acestei aldimine va destabiliza protonul α al aminoacidului provocând o extindere a delocalizării electronice la centrul de reacție.

Această delocalizare este sesizabilă prin efectul batocrom 360 nm inițial în absența aminoacidului la 430 nm. Mobilitatea protonului este accentuată de asistența grupării amino a restului de lisină, rămas liber. În urma expulzării protonului din α și al deplasărilor de electroni consecutive, aldimina se va transforma în **cetimină**. Aceasta, prin hidroliză

va elimina α-cetoacidul (1), corespunzător aminoacidului inițial. Concomitent se va forma piridoxamina. Aceasta, va reacționa cu α-cetoacidul (2) reactant, rezultând o nouă cetimină. Aceasta, prin medierea aceluiași rest de lisină se va transforma în aldimină care prin hidroliză va forma aminoacidul 2.

Reacția de decarboxilare a aminoacizilor care se realizează cu aminoacid decarboxilaze piridoxalfosfat dependente decurge după un mecanism asemănător, cu deosebirea că deplasarea electronică are loc de la gruparea carboxilat către nucleul piridinic.

4.4.4.1.5 Vitamina B12 (Cobalamina)

Vitamina cea mai eficientă (prin raportul răspuns/doză) este vitamina B_{12}. Nu este produsă nici de animale nici de plante, fiind procurată de la bacterii. Doza necesară zilnic pentru un adult este de cca. 3 mg/zi. Anemia pernicioasă, este o maladie a bătrâneții, caracterizată prin eliminarea urinară a unor mari cantități de acid metil malonic. MINOT și MURPHY (1924) au observat că boala, care reprezintă unul dintre efectele carenței acestei vitamine, a putut fi tratată cu ficat crud. De aici s-a separat un preparat antipernicios, care a constituit sursa din care s-a izolat ulterior vitamina B_{12}.

Se pare că dintre compușii nonpolimerici, vitamina B_{12} posedă una dintre cele mai complexe structuri. Elucidarea sa a făcut necesară utilizarea difracției de raze X. Performanța la acea dată (1961) aparține grupului lui Dorothy C. HODGKIN.

Vitamina B_{12} propriuzisă, sau ciancobamida, sau denumirea intrată în uz cianocobalamina conține:

- un *nucleu corinic*, format din patru cicluri pirolice unite fie direct fie prin intermediul unei punți metenice. Nucleul corinic este puternic substituit, conținând opt grupe metil, trei resturi acetamidice și patru propionamidice.
- un *ion central de cobalt* care poate avea numărul de oxidare +3, +2 sau +1. Acesta întocmai ca și ionul de fer din feroporfirine este hexacoordinat. Patru dintre coordinații sunt realizate de atomii de azot pirolici. A cincea coordinație se realizează de către un atom de azot aparținând unui nucleu dimetil benzoimidazolic, legat de nucleul corinic printr-o legătură fosforibozică. Cea de-a șasea coordinație este realizată de componente variabile: CN^-, $-CH_3$, HO^- sau 5' adenozină[43].

[43] Compușii corinici corespunzători sunt codificați CNCbl, MeCbl, HOCbl și AdoCBl

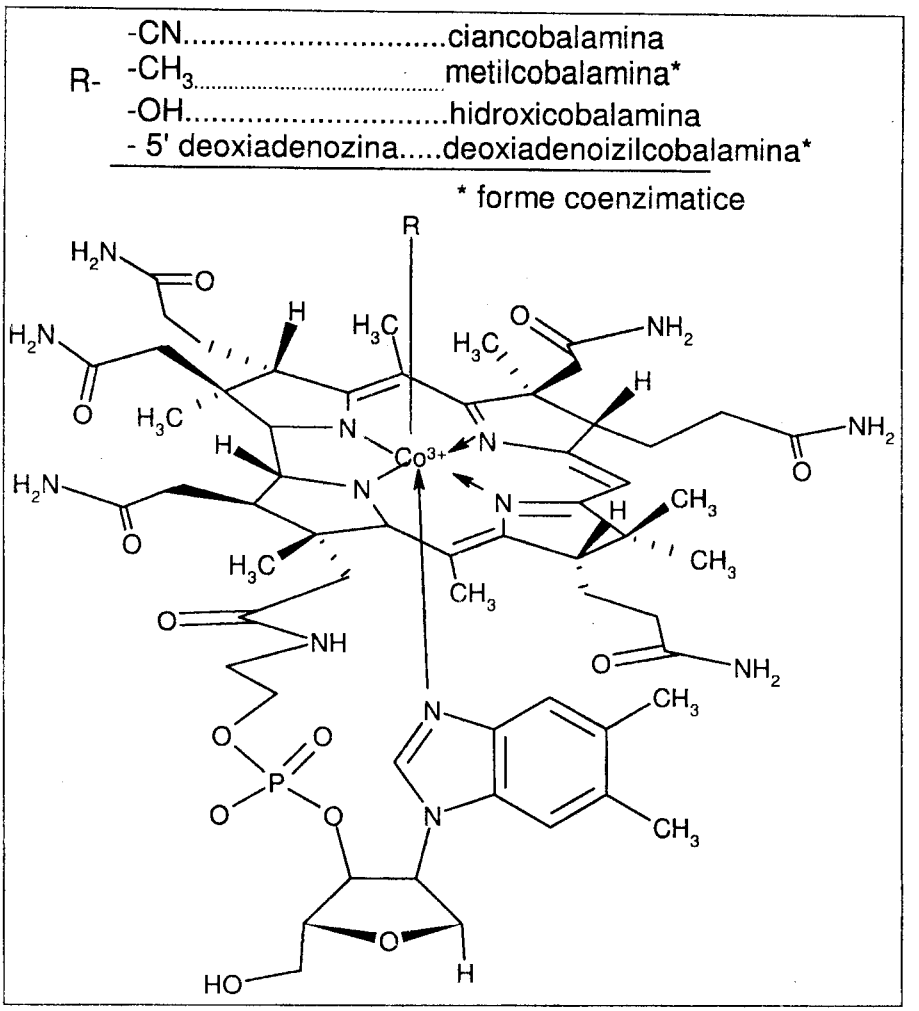


Fig.4.56. Structura Cobalaminelor (cobamidelor)

Deși s-a realizat sinteza chimică a vitaminei B_{12}, în prezent produsul comercial se obține prin biosinteză folosind în acest scop propionobacterii precum *Propionibacterium shermanii* respectiv *freundenreichii* sau *Pseudomonas denitrificans.* Precursorii utilizați sunt 5,6 - dimetilbenzoimidazol, acid δ-aminolevulinic și aminopropanol.

Transformarea vitaminei în coenzima cea mai răspândită, *5'-deoxiadenozilcobalamina* se realizează prin două etape reductive, catalizate de flavinreductaze, care conduc la formarea intermediarului B_{12s} în care cobaltul se găsește în starea de oxidare +1. Acest intermediar are însușiri supernucleofile, putând ataca metilenul 5' din ATP (*Fig. 4.57*).

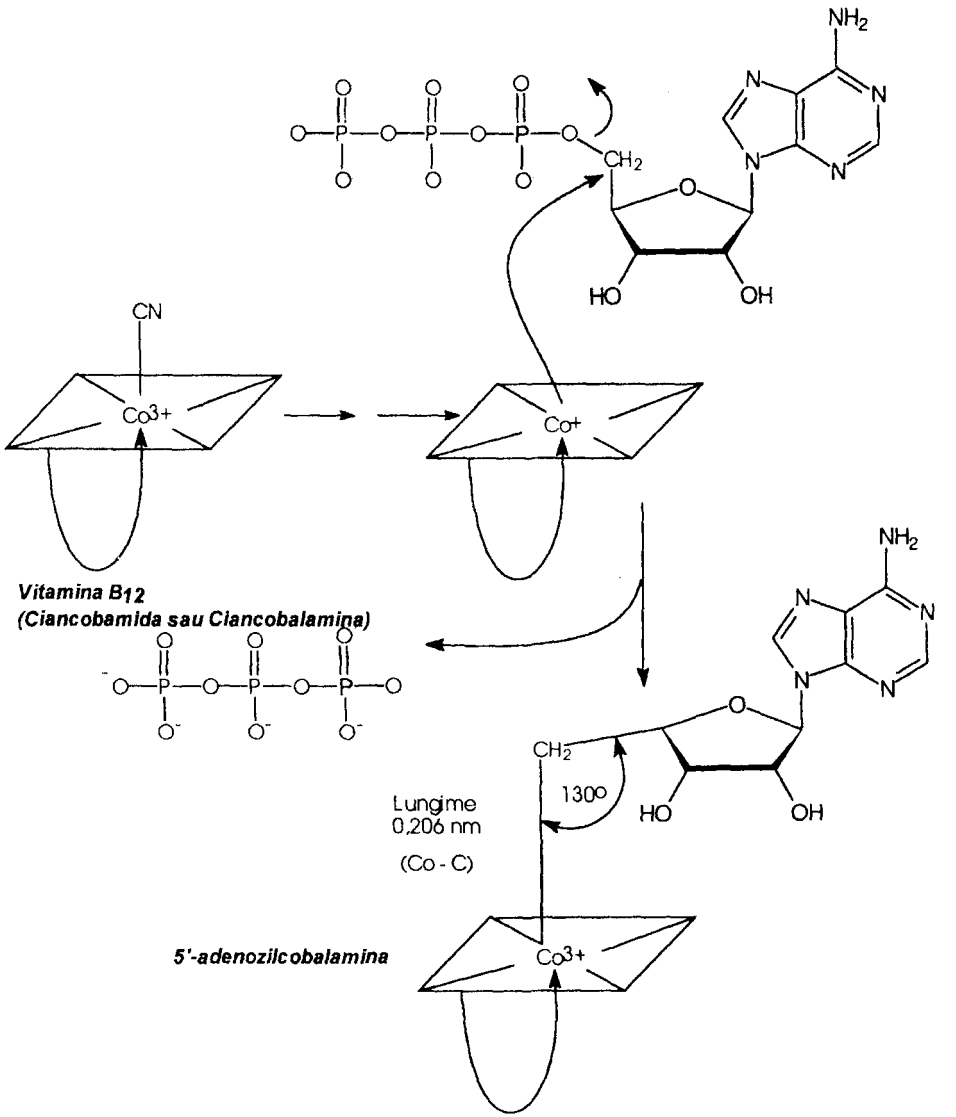


Fig.4.57. Formarea AdoCbl din CNCbl (Vitamina B12)

Legătura Co – C din AdoCbl, cu o lungime de 0,205 nm, iar unghiul de valență Co-C-C de 130°, are un caracter intermediar ionic – covalent. Această legătură se poate desface heterolitic în două moduri, formând resturi cobamidice cu Co^{+}, (B_{12s}) respectiv Co^{3+} (B_{12a}). De asemenea, legătura Co-C se poate desface homolitic, cu formarea restului cobamidic cu Co^{2+} (B_{12r}).

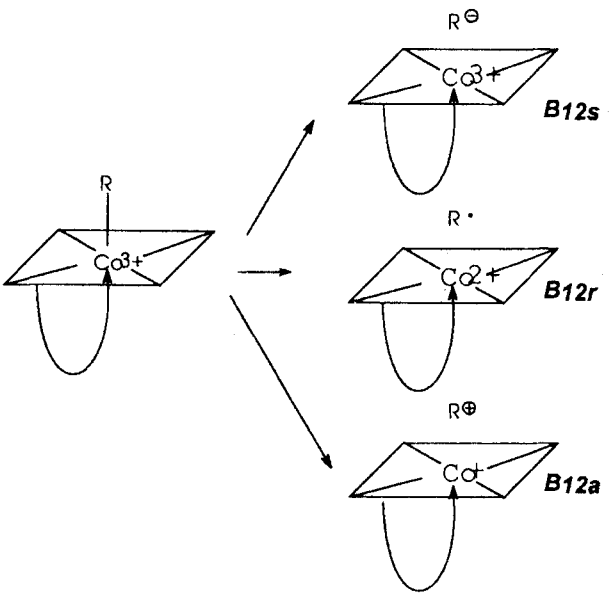


Fig.4.58. Posibilităţi de clivare a legăturii Co-C în AdoCbl, respectiv MeCbl

Existenţa acestor forme justifică reactivitatea coenzimei. Reacţiile catalizate de cobalamină (AdoCbl) se pot sistematiza în trei tipuri:

1. reacţii de transpoziţie
2. reacţii de reducere a ribonulcleotidelor la deoxiribonucleotide (la unele bacterii).
3. reacţii de metilare, la care participă şi metil tetrahidrofolatul.

Vom detalia aceste reacţii în cele ce urmează:

Transpoziţii catalizate de cobamide

Cele mai frecvente cobamide utilizate de organisme pentru realizarea transpoziţiilor sunt AdoCbl şi HOCbl. Se cunosc şi date despre MeCbl.

Mecanismul general este prezentat în *Fig. 4.59*

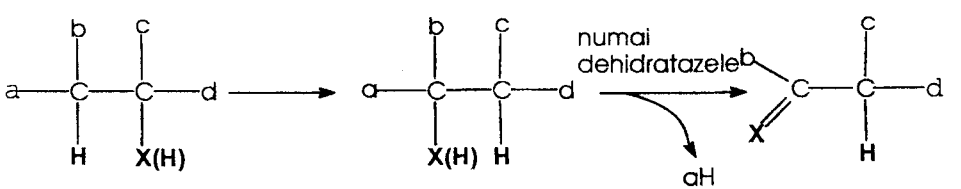


Fig.4. 59. Mecanismul general al transpoziţiilor asistate de cobamide

Exemple:

Nr.crt	Enzima	a	b	c	d	X(H)
1	Dioldehidraza	OH	H	H	Me sau H	OH
2	Glicerol dehidraza	OH	H	H	CH_2OH	OH
3	Aminoetanol amoniac liaza	OH	H	H	Me sau H	NH_2
4	(R)-Metilmalonil-CoA mutază	Me sau H	H	CO_2H	H	COSCoA
5	(S)-Glutamat mutază	H	H	CO_2H	H	$CHNH^+{}_3CO_2^-$
6	β-Metilenglutarat mutază	H	H	CO_2H	H	$(C=CH_2)CO_2^-$
7	Aminoacid mutaze	Me_2CH	H	CO_2H	H	NH_2

Reacțiile de transpoziție au un mecanism radicalic. AdoCbl(III) va disocia homolitic formând radicalul 5'-deoxiandenozilic (Ado•) și Cbl(II). Radicalul 5' deoxiadenozilic va extrage din substrat (**SH**) hidrogenul care urmează a fi schimbat. Se formează în acest mod radicalul **S•**. În acest radical, grupa migratoare X, se va deplasa ca radical de la poziția inițială la atomul cu electronul impar, formând în acest mod produsul radical (**P•**). Acesta se va stabiliza prin captarea unui atom de hidrogen din 5' metil adenozină (**AdoH**). Se formează astfel (**Ado•**) care prin atașare la **Cbl(II)**, va reface **AdoCo(III)**, precum și produsul final (**PH**).

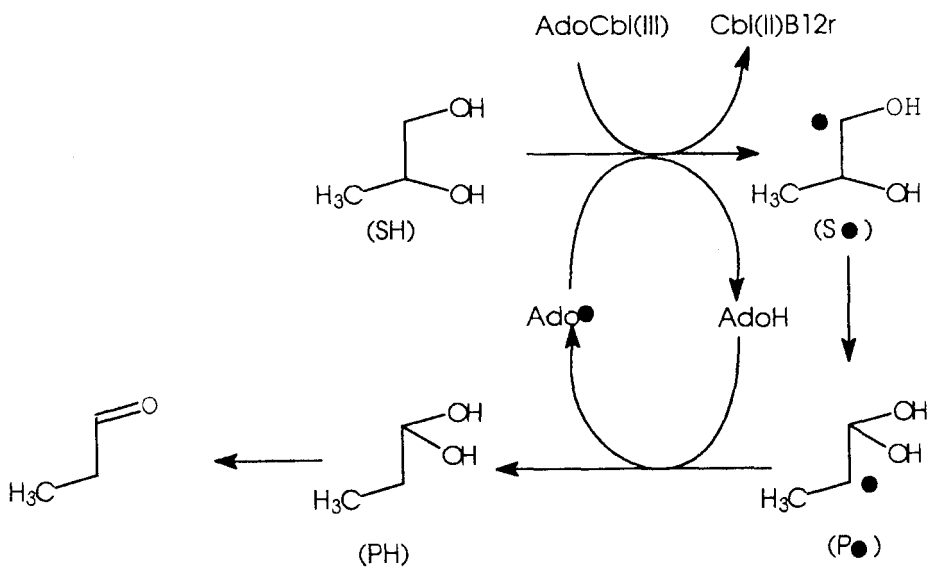


Fig. 4.60. Mecanismul acțiunii dioldehidratazei

Dehidratazele cobalamino dependente acționează asupra unor dioli vicinali. Prin migrare, aceştia vor forma dioli geminali, care vor elimina apă formând compușii carbonilici corespunzători (*Fig. 4.60*).

4.4.4.1.6. Nicotinamida sau niacina

intră în compoziția coenzimelor sub forma unor dinucleotide (*Fig.4.61.*): Nicotinamid Adenin Dinucleotida (NAD) sau *N*icotin-amida*A*denin*D*inucleotidfosfatul.(NADP) Acestea sunt formate din acid adenilic şi Nicotinamidoribonucleotida. Funcția redox, caracteristică acestor cofactori este asigurată de nucleul piridinic. În acest nucleu intră cei doi electroni dar numai un singur proton (un ion hidrură). Celălalt proton rămâne în mediu.

Enzimele nicotinamidice manifestă o stereospecificitate deosebită. În cazul lactatdehidrogenazei (E.C.1.1.1.27), ionul hidrură preluat de nucleul piridinic, provine de la atomul de carbon chiral.

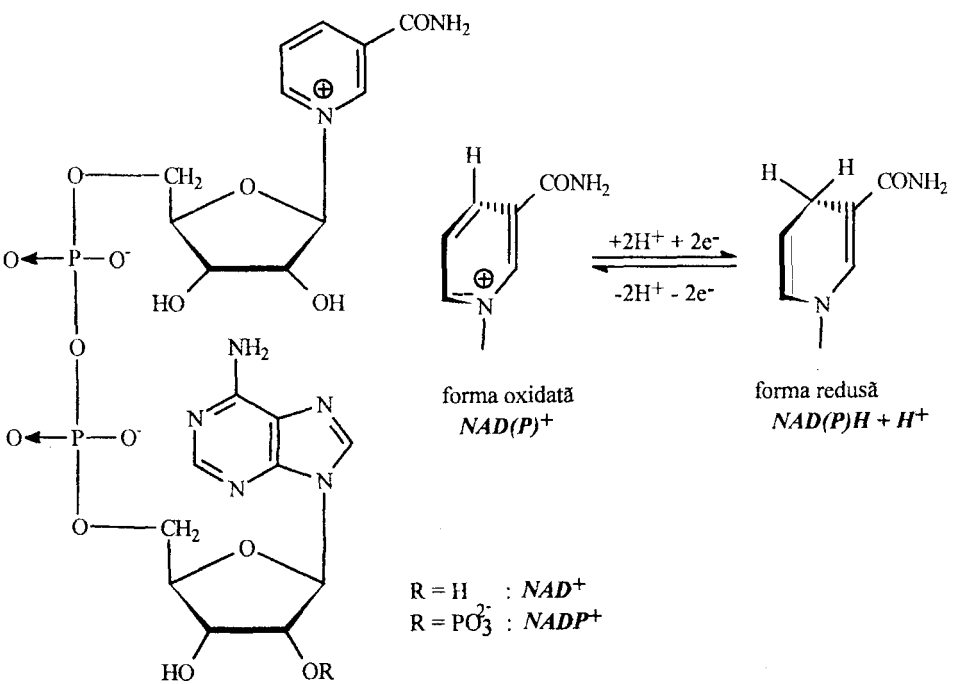


Fig.4.61. Coenzimele nicotinamidice

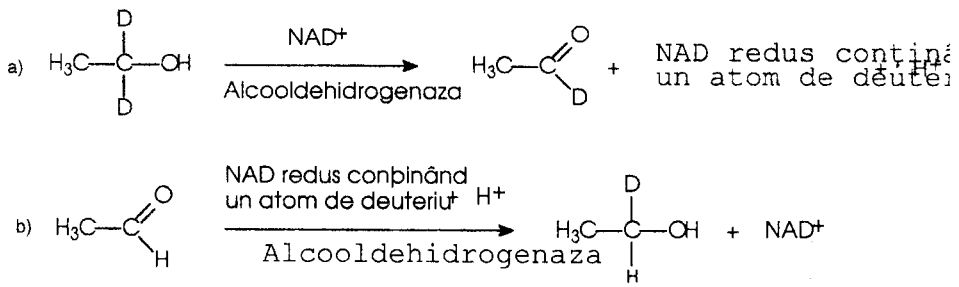


Fig.4.62. Evidențierea hidrogenului care se transferă în reacțiile redox NAD - dependente

În cazul alcool dehidrogenazei (E.C.1.1.1.1), ionul hidrură preluat de nucleul piridinic provine de la gruparea metilen, așa după cum s-a demonstrat într-un experiment efectuat încă din anul 1950 de către Birgit VENNESLAND și Franck WESTHEIMER. Aceștia au folosit ca substrat etanol dideuterat la C1.

NAD-ul deuterat obținut a fost utilizat apoi pentru reducerea acetaldehidei nedeuterate. În urma experimentului s-a constatat că deuteriul a fost transfer pe acetaldehidă (*Fig.4.62.*)

Efecte stereoelectronice la oxidoreductazele nicotinamidice

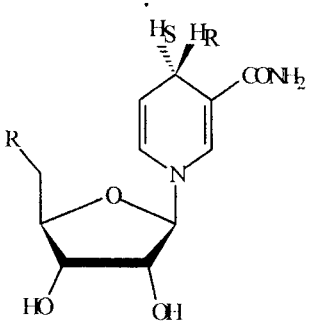


Fig.4.63. Protonii diastereotopici din poziția 4-a nucleului nicotinamidic al NAD(P)H

Stereospecificitatea dehidrogenazelor nicotinamidice a fost intens studiată. Cei doi hidrogeni din poziția 4 a heterociclului redus legat N- glicozidic de riboză sunt diastereotopici[44]. (*Fig.4.63.*) Enzimele transferă fie hidrogenii H_R (pro-R) fie H_S, (pro-S) din structura nicotinamidică.

În analiza stereospecificității acestor enzime au fost utilizate argumente stereoelectronice. S-a plecat de la faptul că perechea de electroni ai atomului de azot heterociclic preferă o poziție antiperiplanară cu perechea de electroni ai legăturii carbon - oxigen adiacentă azotului din ciclul ribozei. Această ipoteză este în acord cu un *efect exoanomeric* și conduce la concluzia că rotația în jurul legăturii N-glicozi-

[44] Substituția unuia dintre ei cu orice atom sau grupare, va genera un anume diastereomer. Ei prezintă un motiv particular în spectrometria de ^{1}H-RMN.

dice este împiedicată. Pentru a facilita întrepătrunderea dintre perechea de electroni ai azotului și orbitalul de antilegătură σ* asociat legăturii carbon-oxigen, orbitalii de legătură ai azotului se vor plasa în afara planului inițial, ceea ce va conduce la modificarea conformației plane a formei dihidronicotinamidice. În aceste condiții, apare o barieră energetică a rotației în jurul legăturii N-glicozidice care duce la apariția unor conformeri efectivi. Prin conformația barcă formată, hidrogenul axial din poziția 4 a heterociclului cu azot devine sin cu perechea de electroni a azotului, în timp ce cel ecuatorial devine anti. Eliminarea hidrogenului axial este favorizată termodinamic, atât datorită poziției axiale, mai bogată în energie dar și naturii viniloge de tip sin cu perechea de electroni neparticipanți ai azotului. (*Fig.4.64.*).

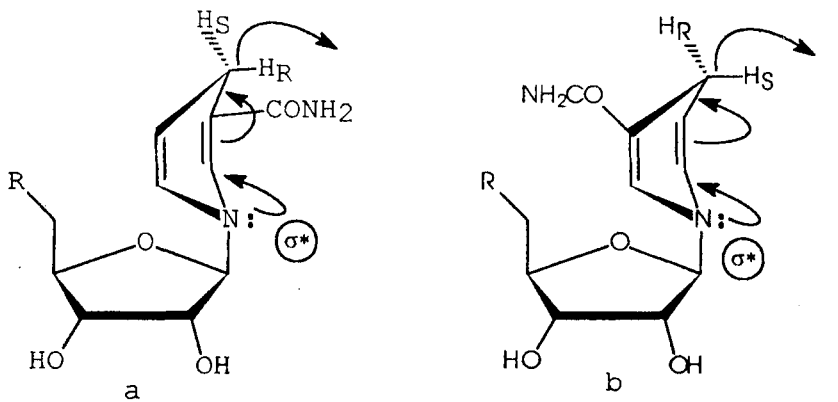


Fig.4.64. Explicarea stereospecificității transferului ionului hidrură din NAD(P)H

În consecință, conform acestei ipoteze stereoelectronice, hidrogenul din poziția 4, pro-R se va elimina dintr-un conformer anti, în timp ce cel pro-S se va transfera dintr-un conformer sin. (*Fig.4.64.*) Efectul anomeric exo- este slab ca intensitate, de ordinul a 1–2 kcal·mol^{-1}. Aceasta face ca nucleul dihidropiridinic să se poată roti în jurul legăturii N-glicozidice. Totuși, enzima este capabilă să discrimineze între cei doi conformeri cvasistabili, eliminând (transferând) doar hidrogenul axial, pro-R sau pro-S, în funcție de topologia situsului catalitic al enzimei.

Într-adevăr, studii de difracție de raze X au confirmat că enzimele care elimină hidrogenul pro R din structura coenzimei reduse o leagă în conformație anti în timp ce dehidrogenazele care transferă hidrogenul pro S leagă substratul în conformație sin.

În celule se găsește atât NAD (redus și oxidat) cât și NADP (redus și oxidat). Diferența dintre aceste două forme este dată de raportul concentrațiilor formei oxidate și reduse.

$$\text{Astfel: } \frac{[NAD^+]}{[NADH + H^+]} \gg 1 \; ; \; \frac{[NADP^+]}{[NADPH + H^+]} \ll 1$$

Deși ambii cofactori au potențialul redox standard foarte apropiat $\Delta E \approx -0{,}32$ V, NAD^+ este utilizat în procese oxidative, deci pe căile catabolice, iar $NADPH + H^+$ este găsit în principalele căi anabolice.

Dintre enzimele NAD^+ dependente se pot cita: alcool dehidrogenaza, lactat dehidrogenaza, malatdehidrogenaza, glicerofosfatdehidrogenaza, glicerinaldehid–3-fosfatdehidrogenaza, iar dintre enzimele $NADP^+$ dependente: glucozo–6-fosfatdehidrogenaza, glutationreductaza.

Datorită modificării cromoforului la nivelul nucleului piridiliu, procesele redox catalizate de enzimele NAD sau NADP dependente, mersul reacției poate fi monitorizat prin intermediul benzii de absorbție de la 340 nm, care apare în forma redusă.

4.4.4.1.7. Biotina

Funcționează ca un transportor de carboxilat în reacții de carboxilare enzimatică. Apare ca grupare prostetică fiind atașat amidic de gruparea ε-amino a unui rest lizinic. Motivul biotină - lisină este cunoscut sub numele de biocitină (*Fig.4.65.*).

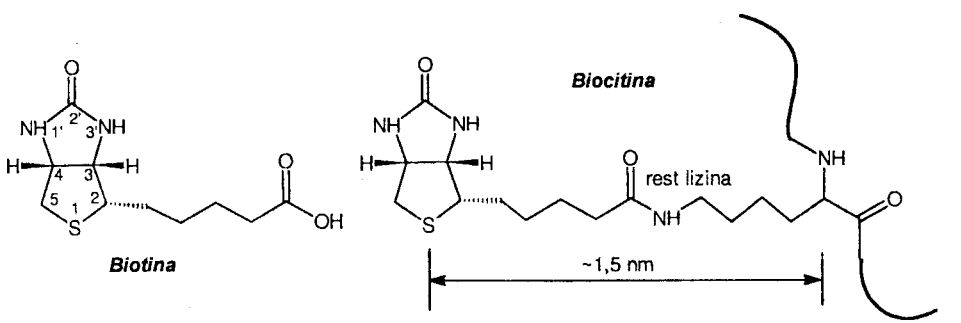


Fig.4.65. Biotina și atașarea acesteia de apoenzimă

Legarea carboxilatului se face prin intermediul azotului din poziția 1'. Carboxilatul este preluat de către biotină din forma de carboxifosfat, format la rândul său prin fosforilarea ATP – dependentă a bicarbonatului (*Fig.4.66.*):

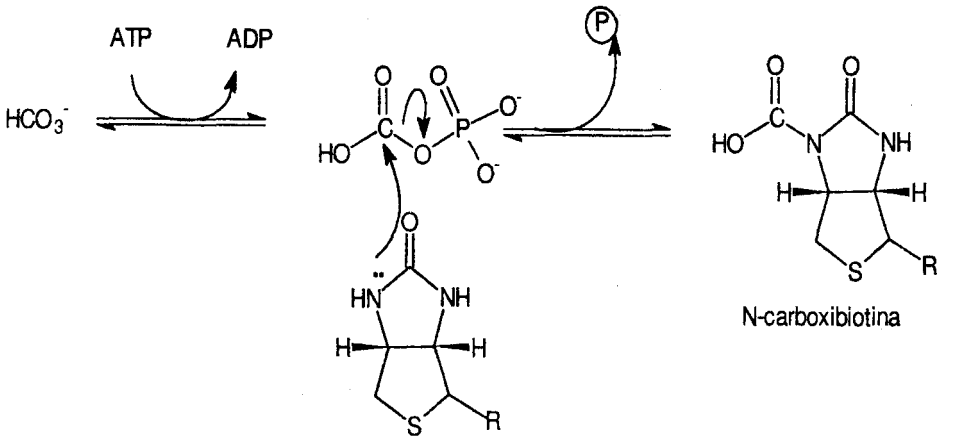


Fig.4.66. Formarea carboxibiotinei

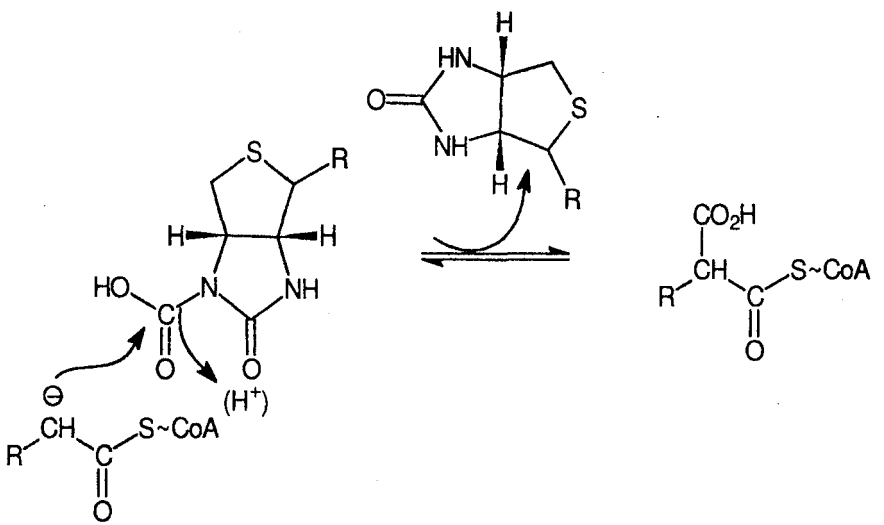


Fig.4.67. Transferul carboxilatului de pe biotină pe substrat

Sub formă de carboxibiotină, carboxilatul devine suficient de susceptibil de atac nucleofil astfel încât reacțiile de carboxilare se vor face prin intermediul unor centre nucleofile (*Fig.4.67*):

Prin acest mecanism se pot carboxila: piruvatul, acetilCoA, propionilCoA, metilcrotonilCoA, geranilCoA, ureea, formându-se respectiv oxaloacetatul, malonil CoA, metilmalonil CoA, carboxigeranil CoA, N-carboxiureea etc. *Fig.4.68.*

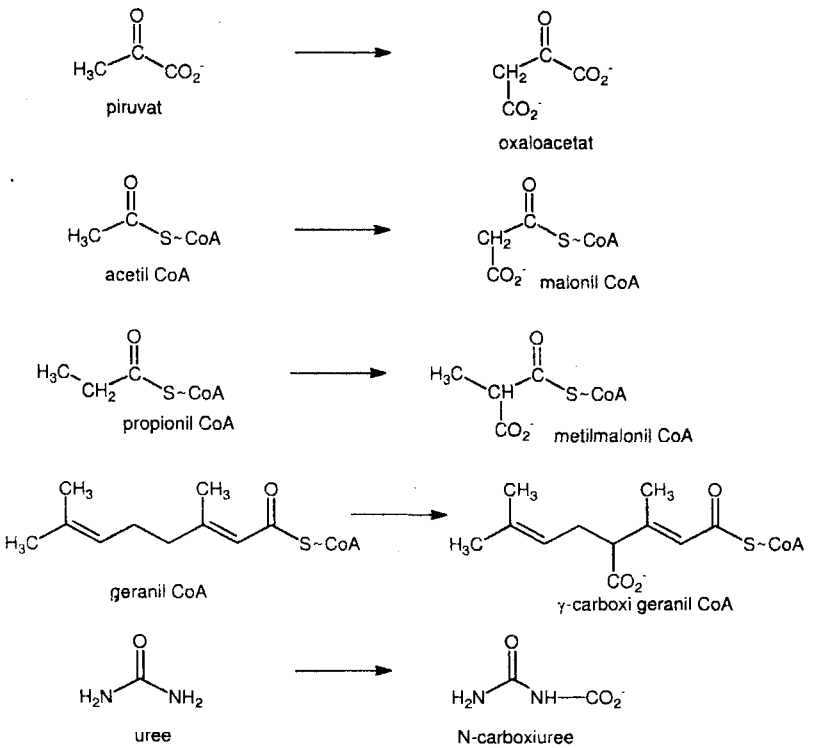


Fig.4.68. Carboxilări biotindependente

Toate enzimele biotin dependente sunt multimerice. Ele realizează transferul carboxilatului prin mecanisme ping-pong posedând componente monomerice de legare a sursei de carboxilat (carboxifosfatul), de legare a substratului destinat carboxilării și de legare a biotinei. Prin intermediul brațului de zece atomi de care este legat biciclul biotinei de catena proteică, se realizează o pendulare a purtătorului de carboxilat între sursă și destinație (*Fig. 4.70.*).

Fig.4.69. Structura complexului avidină-biotină

În albușul de ou crud, se găsește o proteină **avidina** care are o afinitate extrem de ridicată pentru biotină (constanta de disociere, Kd ≅ 10^{-15} M) – *Fig. 4.69.* Prezența avidinei conduce la preluarea biotinei și excesul utilizării albușului de ou crud se manifestă prin sindromul hipovitaminozei care constă în pierderea părului, și apariția dereglărilor dermatitice.

De remarcat faptul că din cei opt izomeri optici, doar unul are activitate biologică.

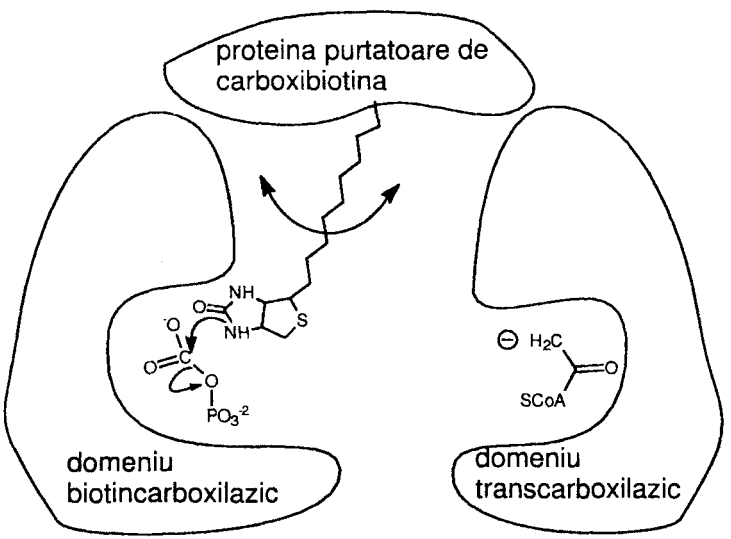


Fig.4.70. Modul de acțiune al carboxilazelor biotindependente

De exemplu acetil CoA carboxilaza din *Escherichia coli*, constă din trei tipuri de subunități: (1) *biotincarboxilaza* un dimer format din două unități de 100 kD; *proteina purtătoare de carboxibiotină,* un monomer de 22 kD, de care prin intermediul unui rest lisină se leagă biotina și subunitatea *transcarboxilaza,* unde are loc transferul carboxilatului, un dimer cu două subunități de 90 kD. Lungimea brațului de care estre atașat biotina îi permite acesteia să penduleze între unitățile biotincarboxilazică și cea transcarboxilazică.

4.4.4.1.8. Acidul lipoic

Este o substanță care funcționează ca grupare prostetică, cu rol de transportor pentru diferite grupări acil. Structura sa conține o punte disulfurică, ce conferă moleculei labilitate la reducere. În consecință, va exista într-o formă oxidată și una redusă (*Fig. 4.71.*).

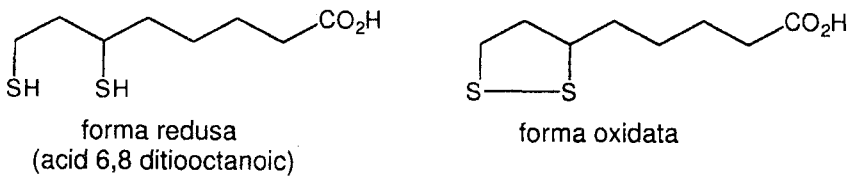


Fig.4.71. Acidul lipoic forma oxidată și redusă

Întocmai ca și în cazul biotinei legarea de apoenzimă se face prin intermediul unui rest de lizină.

Acidul lipoic este întâlnit în două complexe enzimatice implicate în metabolismul energetic: *piruvat dehidrogenaza* și *α-cetoglutarat dehidrogenaza.* Aceste complexe enzimatice catalizează reacții de decarboxilare oxidativă a acestor α-cetoacizi cu formarea de derivați de CoA[45]:

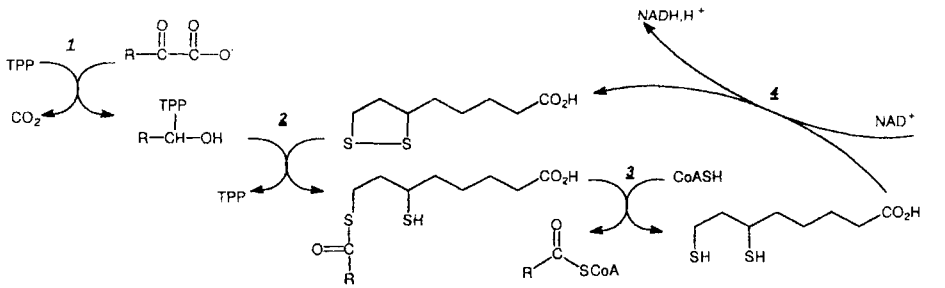


Fig.4.72. Participarea acidului lipoic la transformarea α-cetoacizilor (acidul piruvic și acidul α-cetoglutaric)

Etapele procesului de decarboxilare oxidativă (*Fig. 4.72.*) sunt:

1. legarea pe coenzima tiaminpirofosforică și realizarea decarboxilării
2. transferul restului acil pe acidul lipoic aflat in forma oxidată. Rezultă acidul ω-S acil-dihidrolipoic.
3. transferul restului acil pe coenzima A. Rezultă acil-CoA și acidul dihidrolipoic.
4. oxidarea acidului dihidrolipoic cu ajutorul coenzimei NAD^+.

4.4.4.1.9. Acidul folic

Coenzimele derivate de la acidul folic sunt componenți de transfer al unei unități care conține un singur atom de carbon. Atomul de carbon transferat se poate afla într-una din stările de oxidare –2; 0 sau +2. (*Fig.4.75.*)

[45] Detalii suplimentare la capitolul legat de catabolismul glucidic în Vol II

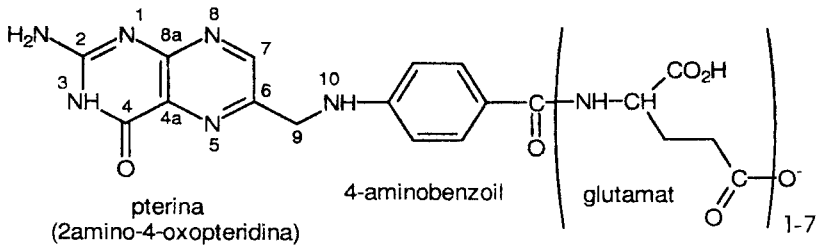


Fig. 4.73. Acid folic şi componentele sale

Acidul folic (în fapt există mai mulţi acizi folici – vezi mai departe) are în structura sa trei componente: pteridina, acidul 4-aminobenzoic şi unul până la 7 resturi de acid glutamic (*Fig.4. 73.*). Coenzimele derivă de la acidul tetrahidrofolic (THF), format prin acţiunea reductivă a *dihidrofolat reductazei (Fig.4.74).*

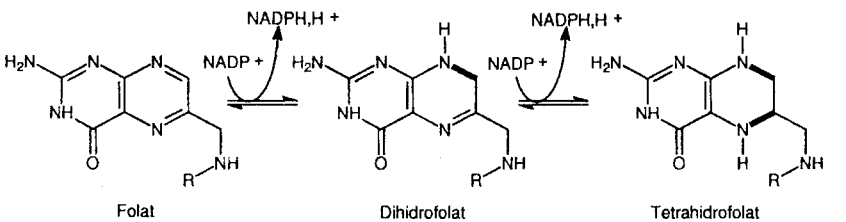


Fig.4.74. Forme reduse ale acizilor folici

Joncţiunea între unitatea de carbon care se transferă şi THF se realizează prin intermediul atomilor de azot N^{10} sau/şi N^5, după cum se prezintă în *Tab.4.4.*

O componentă interesantă din structura acidului folic este acidul 4-aminobenzoic. Pe lângă participarea sa la formarea folaţilor, această substanţă îndeplineşte si rolul de substanţă ecran pentru radiaţiile UV posedând un maxim de absorbţie la 297,5 nm. Prin esterificare cu N,N'-dietil–2-aminoetanol, acidul 4-aminobenzoic formează 4-aminobenzoatul de N,N'-dietil–2-aminoetil cunoscut sub numele de procaină, principiul activ din preparatele Gerovital.

Tab.4.4. ***Forme ale acizilor folici care realizează transferul unei unităţi de carbon***

Număr de oxidare al atomului de carbon transferat	forma sub care poate apare atomul de carbon	Structura unităţii de carbon care se transferă	forma THF
–2	CH_3OH (cel mai redus)	CH_3-	N^5-metil THF
0	Formaldehidă CH_2O	-CH_2-	N^5,N^{10}-metilen THF
		-CH=O	N^5-formil THF
+2	formiat (cel mai oxidat)	-CH=O	N^{10}-formil THF
		-CH=NH	N^5-formimino THF
		-CH=	N^5,N^{10}-metenil THF

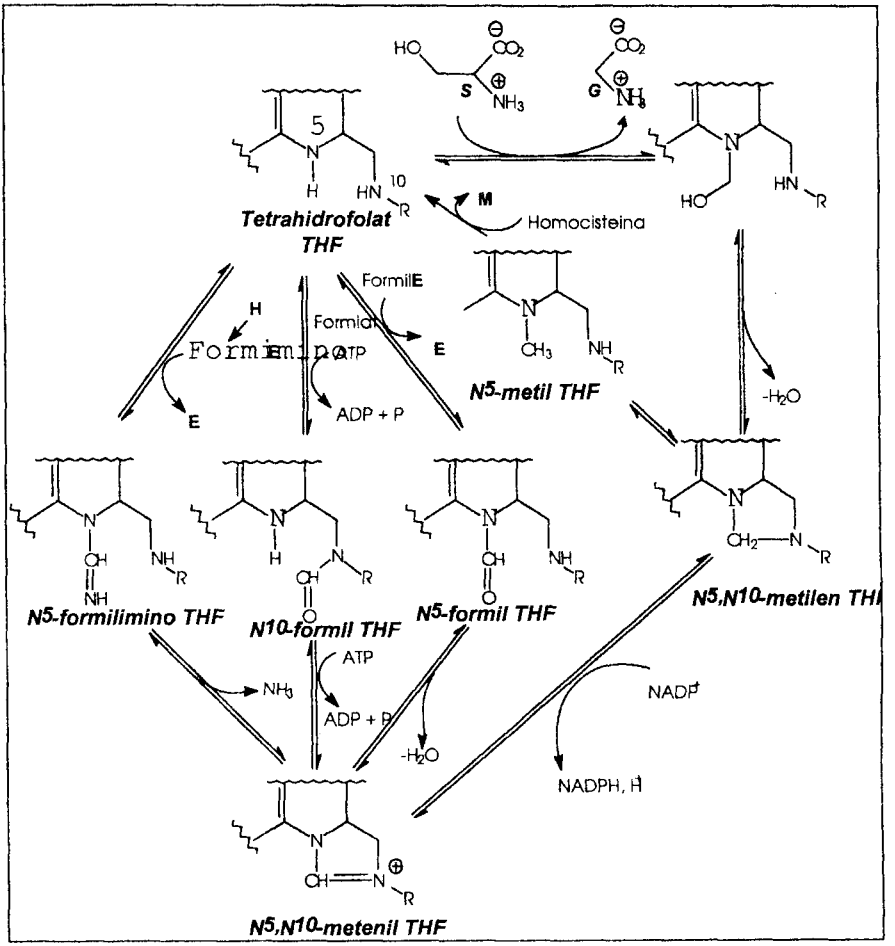
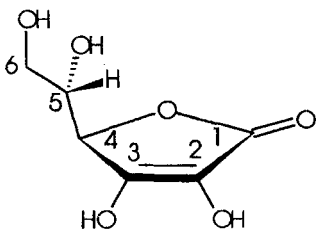


Fig.4.75. forme de transformare ale THF în vederea introducerii unui atom de carbon în diferite stări de oxidare

4.4.4.1.10. Vitamina C

Are una dintre cele mai simple structuri dintre toate vitaminele. (*Fig.4.76*). Se găsește în toate ființele vii, dar nu poate fi sintetizată de om, primate, cobai unele specii de păsări și pești. Lipsa vitaminei C, din aceste specii se explică prin absența unei enzime cheie din sinteza acestui compus: L-gulono-γ-lactonoxidaza (*Fig. 4.78.*).

Caracterul acid al acestei substanțe este conferit de cei doi hidroxili atașați de inelul lactonic. Constantele de aciditate sunt foarte diferite datorită legăturilor de hidrogen intramoleculare ce se formează atât în molecula în stare neionizată cât și in urma ionizării uneia dintre grupările hidroxil ($Ka_1=8{,}0\cdot10^{-5}$ și $Ka_2=1{,}6\cdot10^{-12}$).



Acidul ascorbic
(Vitamina C)

Fig. 4.76.

În organism intervine în mai multe procese redox.
Participarea sa la aceste procese se bazează pe reacțiile din *Fig. 4.77.*

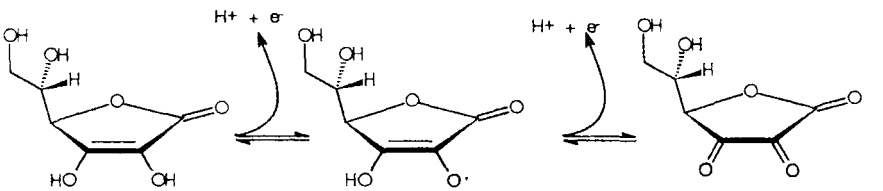


Fig. 4.77. Formele acidului ascorbic în reacțiile de oxidoreducere la care participă

Hidroxilarea prolinei și a lizinei din colagen sunt dependente de acidul ascorbic. (vezi colagenul).

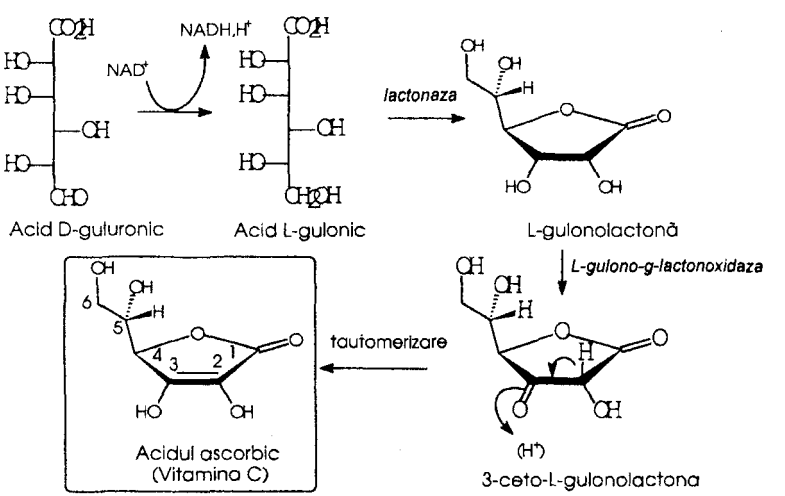


Fig. 4.78. Etapele biosintezei acidului ascorbic

Implicațiile vitaminei C în biosinteza carnitinei

Carnitina este o substanță cu rol de navetă pentru acizii grași liberi. Carnitina poate traversa sistemul membranar mitocondrial atât în stare liberă cât și având atașați covalent acizi grași. În mitocondrie are loc atât degradarea exergonică cât și o parte a biosintezei acizilor grași. Acizii grași sunt substanțe cu conținut energetic specific foarte ridicat. Funcționarea sistemului muscular, a creierului, a inimii, în condiții de efort prelungit depinde de carnitină, Ori aceasta este biosintetizată într-o cale metabolică care pleacă de la lisină și care include două etape oxidative dependente necesar de acidul ascorbic și de Fe^{2+}. Ultima dintre constă în hidroxilarea enantiospecifică a γ-butirobetainei la carnitină. De aceea carența în vitamina C se manifestă și prin disfuncții ale sistemului muscular, angină pectorală (dureri la nivelul inimii) și stare de confuzie.

Implicațiile vitaminei C în biosinteza catecolaminelor

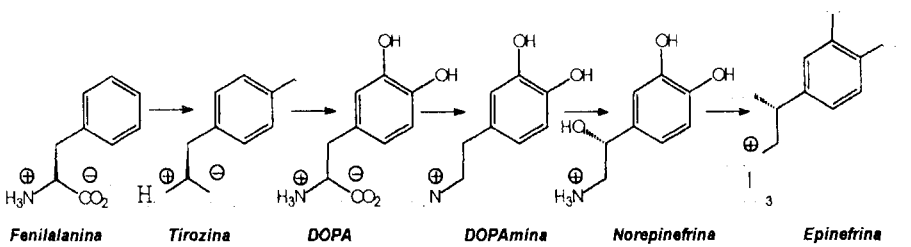


Fig. 4.79. Secvența transformării fenilalaninei în epinefrină

Acidul ascorbic se implică în procesul de hidroxilare al 3,4-dioxifeniletilaminei – DOPAminei (produs de decarboxilare al dioxifenilalaninei – DOPA). *Fig. 4.79.* Se formează astfel norepinefrina (noradrenalina), care prin metilare trece în epinefrină (adrenalină), un hormon important implicat în reglarea mai multor procese metabolice.

Participarea vitaminei C la alte reacții de hidroxilare

Acidul ascorbic participă la reacții de hidroxilare ale sterolilor, participând astfel la biosinteza hormonilor steroizi și a acizilor biliari, în cortexul suprarenal precum și în ficat. De asemenea vitamina C este implicată în reacții de hidroxilare ale unor substanțe xenobiotice. Prin hidroxilare, acestea devin mai solubile și în plus capătă abilitatea de conjugare cu acidul glucuronic (sau alți acizi uronici), favorizându-se astfel eliminarea lor din organism.

Pe lângă acestea, acidul ascorbic mai participă la:

♦ Procese de oxidoreducere ale unor substraturi aromatice, în special aminoacizi (fenilalanina, tirosina, triptofanul)

♦ Procesele de desaturare ale unor acizi graşi, precum palmitic şi stearic cu formarea acizilor palmitoleic, respectiv oleic

♦ Menţinerea fierului în stare redusă (Fe^{2+}), ceea ce favorizează încorporarea sa în protoporfirine (cu hem, citocromi).

4.4.4.2. Vitamine liposolubile

4.4.4.2.1. Vitaminele A

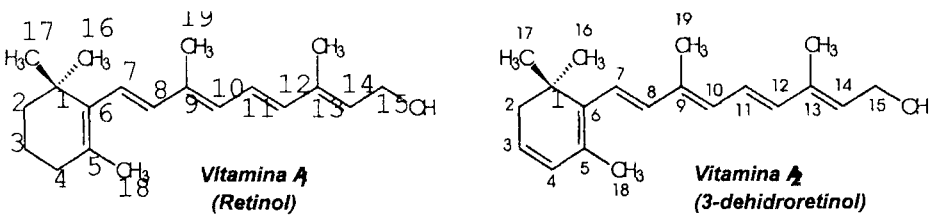


Fig.4.80. Vitamine A

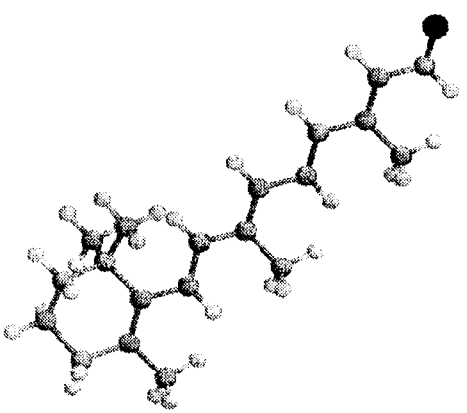


Fig. 4.81. Modelul molecular al all-trans retinalului

Vitamina A există sub mai multe forme. Nici una dintre acestea nu posedă funcţie de cofactor enzimatic. Cea mai comună este **vitamina A_1** sau **retinolul**. În această structură catena laterală diizoprenoidă conţine dublele legături în configuraţie trans. Se mai cunosc **vitamina A_2** sau 3-dehidroretinolul (*Fig.4.80*). S-au identificat izomeri geometrici ai vitaminei A_1 respectiv **izovitamina A_a**. (9-cis retinol), **izovitamina A_b**

(9,13 di-cis retinol), **neovitamina A_b**. (11-cis retinol), **neovitamina A_c**. (11,13 di-cis retinol). Se cunoaște de asemenea și **vitamina A_3** (13 metilen, 13,14 dehidroretinol).

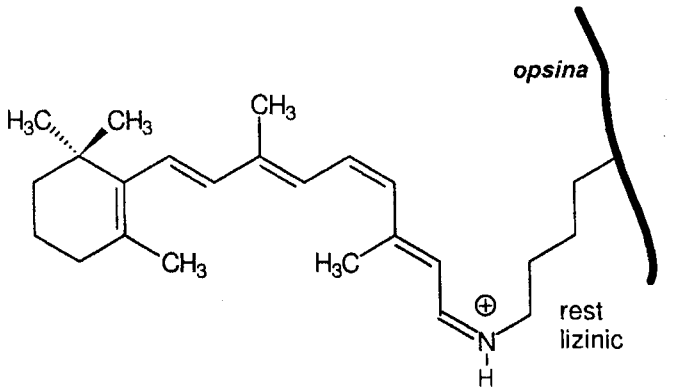


Fig. 4.82. Structura și modul de ancorare al 11-cis-retinalului

Retinolul nu poate fi sintetizat „de novo" de către organismul animal. El poate fi obținut totuși din carotenoide provitaminice (provitamine A). Carotenoidele sunt o clasă de pigmenți ai cărei reprezentanți sunt găsiți atât în regnul vegetal cât și în cel animal. Carotenoidele hidrocarburice (lipsite de oxigen) îndeplinesc rolul de provitamine A, putând fi oxidate enzimatic, cu ruperea catenei, până la retinal.

Deși se cunosc corelații între conținutul de vitamine A, (respectiv carotenoide provitaminice) și conținutul unor produși sau intermediari ai metabolismului lipidic, glucidic, protidic sau al acizilor nucleici, rolul cel mai important al vitaminei A este legat de vedere. În acest proces, este implicat un derivat oxidat al retinolului, **retinalul**.

Informația, sub formă de stimuli luminoși, este recepționată de către celule specializate din retină. Acestea sunt de două tipuri denumite după forma pe care o au: celulele **conuri**, și celulele **bastonașe**. Primele, (cca. 10 milioane) sunt adaptate recepției luminii diurne, puternice, colorate. Celulele bastonașe în număr mai mare (100 – 1000 milioane) sunt adaptate recepției luminii la slabă intensitate (crepusculare). Receptorii propriuzișI sunt cromoproteide care conțin 11-cis-retinal. În celulele conuri există mai multe tipuri de fotoreceptori. Ei diferă prin componenta proteică și asigură recepția culorilor. În celulele bastonașe cromoproteida fotoreceptoare este **rodopsina.**

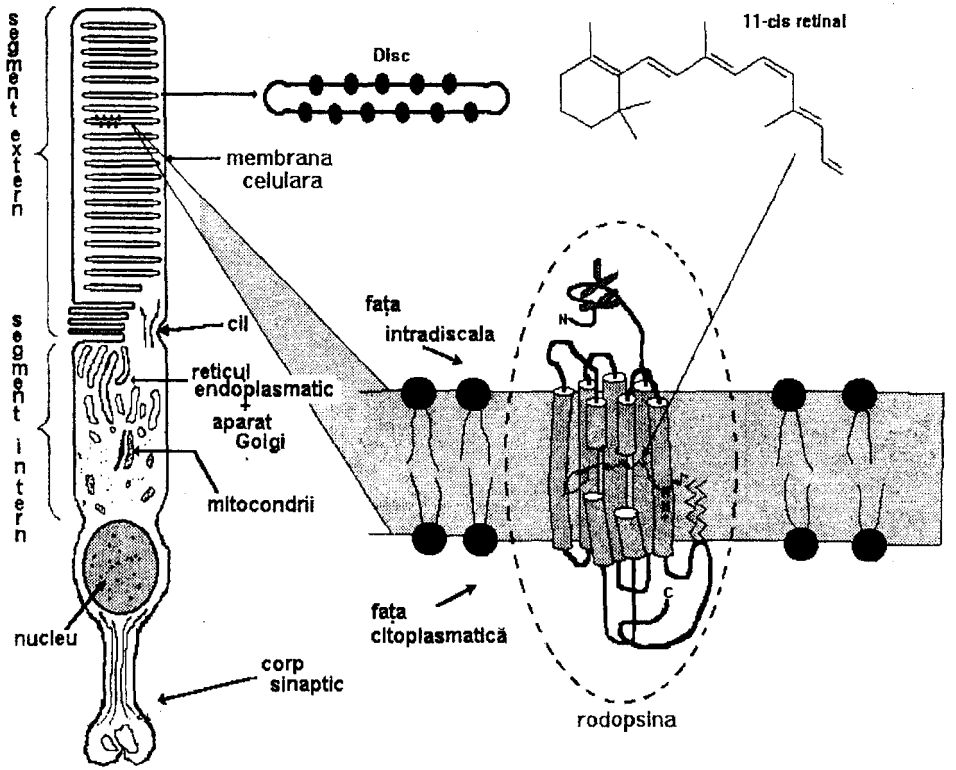


Fig. 4.83. Celula bastonaș și arhitectura fotoreceptorilor

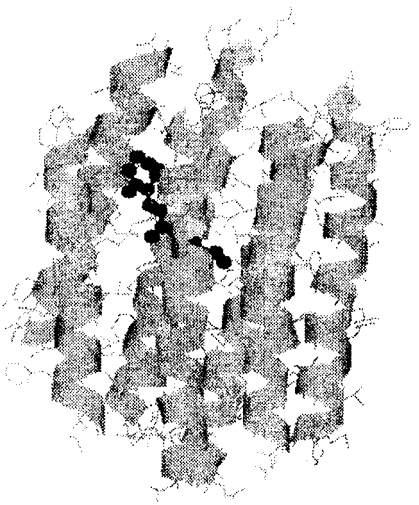


Fig. 4.84. Dispunerea moleculei de retinal în interiorul structurii opsinice

Celulele bastonașe au o structură particulară. Ele sunt formate dintr-un segment intern și un segment extern. *Segmentul intern* conține elementele fundamentale ale celulei (nucleul, mitocondriile, aparatul Golgi, reticulului endoplasmatic etc.) adaptate pentru un proces intens de sinteză proteică dar și pentru obținerea ATP-ului. Acest segment se termină printr-un corp sinaptic, prin care se transmite un semnal electric generat în urma excitației luminoase. În *segmentul extern* se găsesc formațiunile fotoreceptoare, în fapt niște vezicule membranare de formă discoidală, așezate în stivă, în număr de aproximativ 1000 per celulă. În acestea se găsesc inserate moleculele de rodopsină (*Fig.4.83*).

Opsina are o structură monocatenară, heptahelicoidală, în care helixurile se găsesc plasate într-un mănunchi. Capătul N-terminal al acestei proteine se găsește pe fața intradiscoidală fiind glicozilat, iar capătul C terminal se găsește în pe fața citosolică a membranei discoidale. Această porțiune este bogată în serină și treonină, hidroxiaminoacizi susceptibili la fosforilare. Retinalul se găsește plasat în interiorul mănuchiului de helixuri (*Fig.4.84*), atașat de opsină printr-o legătură aldiminică protonată realizată prin intermediul carbonilului retinalului și o grupare ε-amino al unui rest lizinic (Lys 296) din opsină (*Fig.4.82*).

Spre deosebire de clorofilă, care în procesul de fotosinteză, sub influența luminii suferă o reacție de oxidare, expulzând un electron, 11-cis-retinalul, prin fotoexcitare, va suferi o reacție de izomerizare la all-trans retinal. Retinalul all-trans este prezentat în *Fig. 4.81.*

În soluție, reacția de izomerizare a cis-retinalului la all-trans retinal este favorizată energetic. În rodopsină însă, structura 11-cis-retinalului se acomodează mai bine cu vecinătatea proteică decât izomerul său. În starea fundamentală, în care moleculele se găsesc la întuneric, bariera energetică între cei doi izomeri este de cca. 30 kcal. Prin absorbția unui foton, molecula trece într-o stare excitată în care diferența energetică dintre cele două forme se micșorează. Aceasta se datorează creșterii mobilității sistemului de electroni π. Bariera energetică relativ ridicată în stare fundamentală are importanță în diminuarea zgomotului de fond la vederea nocturnă.

Absorbția unui foton va duce la formarea unei prime structuri metastabile **batorodopsina** în care retinalul este izomerizat în forma all-trans. Această formă nu este stabilizată de opsină ca și structura 11-cis și în consecință, prin deplasarea sarcinii pozitive a atomului de azot iminic protonat față de centrul negativ (din structura proteică) care îl stabiliza inițial, apare o deplasare a maximului de absorbție de la 500

nm în rodopsină la 543 nm în batorodopsină[46]. Între batorodopsină și opsină vor apare mișcări relative care se vor opri temporar în structuri intermediare caracterizate prin maximul absorbției, durata tranziției care le formează și temperatura sub care devin stabile (*Fig.4.85*)

Forma finală, metarodopsina II numită și *rodopsina fotoexcitată* (R*), va putea expulza protonul, fenomen însoțit de scăderea maximului absorbției la 343 nm. În urma expulzării protonului, va avea loc disocierea all-trans retinalului de pe opsină.

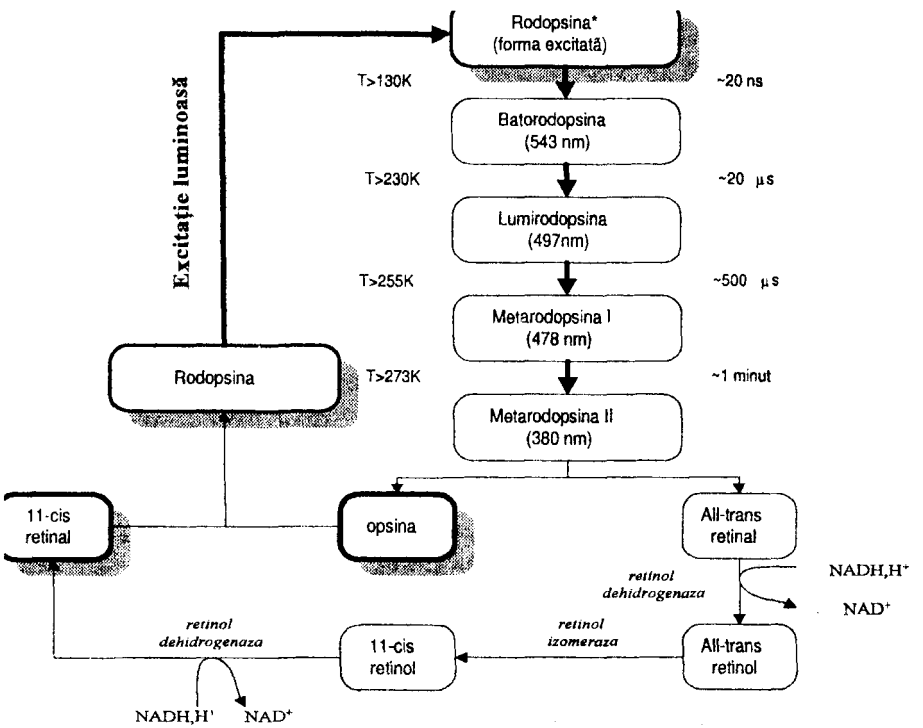


Fig. 4.85. Secvența ciclică a structurilor intermediare ale transformării rodopsinei prin fotoexcitare

Regenerarea 11-cis retinalului se face printr-un proces care implică o succesiune de reacții: 1.de reducere *la all-trans retinol* (catalizat de *retinol dehidrogenaza*), 2. izomerizare la *11-cis retinol* (catalizat de *retinol izomeraza*) și 3. dehidrogenare la *11-cis retinal* cu *retinol dehidrogenaza.*

[46] Deplasarea către lungimi de undă mari este cunoscută sub numele de efect batocrom. De unde și numele intermediarului.

Izomerizarea 11-cis retinolului sub acțiunea luminii, va cauza în cele din urmă reducerea permeabilității membranei plasmatice pentru sodiu (prin închiderea unor canale selective de sodiu din porțiunea externă a celulei), ceea ce va genera o hiperpolarizare a membranei celulare. Această hiperpolarizare este cauza apariției impulsului nervos care se va transmite la creier. Cum are loc această hiperpolarizare ? La întuneric, sodiul parcurge un ciclu, ieșind din celulă prin porțiunea internă a membranei celulei bastonaș printr-o pompă Na^+ / K^+, pusă în mișcare prin sub acțiunea unei ATP-aze[47]. Odată cu ieșirea sodiului, în celulă va intra potasiul. Dacă potasiul se poate reîntoarce difuziv în exteriorul celulei tot în porțiunea internă, sodiul nu va putea reveni în celulă ci va difuza prin spațiul extracitosolic până la zona externă a celulei bastonaș unde, printr-un sistem de pori va reintra în citosol.

Acțiunea luminii asupra rodopsinei va avea ca efect ulterior închiderea porului de sodiu din spațiul extern. Prin aceasta, ciclul sodiului este blocat temporar, sodiul acumulându-se în spațiul extracitosolic, prin aceasta membrana va suferi un proces de hiperpolarizare (sarcina pozitivă spre exterior, iar cea negativă spre interior).

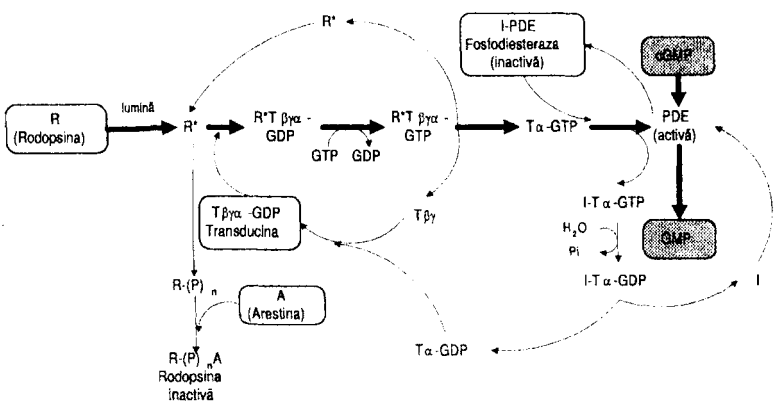


Fig.4.86. Efectul excitării rodopsinei (explicații în text)

Interacțiunea rodopsină - canalul de sodiu este complexă și nu se realizează direct (*Fig. 4.86*). Rodopsina activată (R*) acționează asupra unei proteine multimerice, transducina, pe care o activează. La rândul său, transducina activează o fosfodiesterază care acționează asupra cGMP formând GMP[48].

[47] Transportul este activ, împotriva gradientului de concentrație. Vezi capitolul de transport activ vol. II

[48] detalii la capitolul acizi nucleici

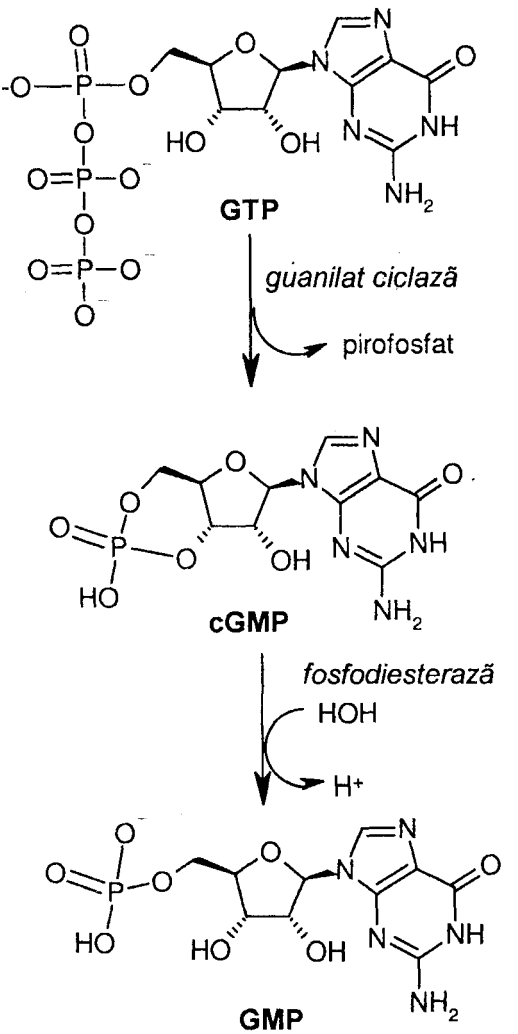


Fig.4.87. Transformarea GTP - GMP

Transducina face parte din categoria proteinelor G, care se pot atașa de diverși receptori de semnale. Ea are o structură trimerică Tαβγ. De subunitatea α, se găsește atașat GDP (acid guanozindifosforic). Sub influența luminii rodopsina activată interacționează cu transducina. În urma acestei interacțiuni GDP-ul atașat de Tα se va schimba cu GTP. Odată format complexul Tαβγ-GTP, rodopsina va fi eliberată, ea putând să interacționeze cu altă moleculă de transducină. O moleculă de rodopsină activată poate interacționa (și activa) cca. 500 molecule de transducină, ceea ce constituie prima etapă de amplificare a semnalului luminos. Totodată, atașarea pe transducină a GTP-ului va determina di-

socierea complexului în subunitățile Tβγ și Tα-GTP. Subunitatea Tα-GTP este forma activă a transducinei și va putea interacționa cu fosfodiesteraza care va genera GMP prin consumarea cGMP (*Fig.4.87.*). **Fosfodiesteraza,** în stare inactivă are o structură tetramerică fiind formată din două subunități catalitice α și β, precum și din două subunități inhibitorii γ. În urma interacțiunii Tα-GTP cu fosfodiesteraza inactivă aceasta din urmă va transfera pe transducină subunitățile inhibitorii devenind activă. Enzima are constanta $k_{cat} = 4200\ s^{-1}$ și raportul $k_{cat}/K_M = 6 \cdot 10^7\ M^{-1} \cdot s^{-1}$ (*Vezi subcap. 4.6.*). Hidroliza cGMP-ului reprezintă a doua etapă de amplificare.

Ca efect al scăderii concentrației cGMP-ului are loc închiderea canalelor de sodiu, din porțiunea externă a celulelor. În aceste condiții pompa Na^+ / K^+ din segmentul interior va funcționa, expulzând sodiul, dar acesta nu va mai putea reintra în celulă. În aceste condiții se formează gradientul de potențial prin membrană, care va declanșa impulsul nervos.

Celula excitată va reveni la forma inactivă, în urma unui complex de evenimente. Primul dintre ele este *dezactivarea transducinei.* Subunitatea α, posedă o activitate GTP-azică[49]. In urma acestui proces subunitatea α va pierde afinitatea pentru subunitatea γ,(I) inhibitorie a fosfodiesterazei. Aceasta, eliberată, se va deplasa prin difuzie până la fosfodiesterază, se va reatașa de aceasta, inhibându-i activitatea. Prin aceasta, nivelul cGMP nu va mai scădea.

Rodopsina în forma activată (R*), va suferi sub acțiunea unei *rodopsinkinaze* o polifosforilare în zona citosolică, la nivelul hidroxililor din restruile de treonină și serină. Prin această fosforilare, molecula poate atașa un inhibitor de natură proteică, **arestina,** care va face imposibilă interacțiunea rodopsinei cu transducina.

De asemenea, pentru închiderea canalelor de sodiu este necesară *reluarea sintezei de cGMP.* Acest proces se realizează prin intermediul ionilor de calciu.

La întuneric, ionii Ca^{2+} ca și ionii de sodiu, intră în celulă, prin segmentul extern, traversând membrana printr-un canal controlat de o concentrație relativ ridicată de cGMP. De asemenea Ca^{2+} iese din celulă prin transport activ, pentru a-și realiza ciclul, odată cu K^+, în contrapar-

[49] realizează hidroliza GTP → GDP + Pi

tidă cu Na^+. Pentru menținerea gradientului electrochimic, la ieșirea unui ion de Ca^{2+} și a unui ion de K^+ în celulă vor intra patru ioni Na^+.

Prin iluminare, concentrația cGMP scade, aceasta va duce la închiderea canalului de intrare a Ca^{2+}. În condițiile în care Ca^{2+} este continuu evacuat concentrația celulară a acestuia scade de cca. 1o ori (de la 500 nM la 50 nM). Scăderea concentrației Ca^{2+}, stimulează guanilat ciclaza care va produce din GTP, cGTP care va deschide canalele de sodiu ducând la reducerea hiperpolarizării membranei celulare.

4.4.4.2.2. Vitaminele D

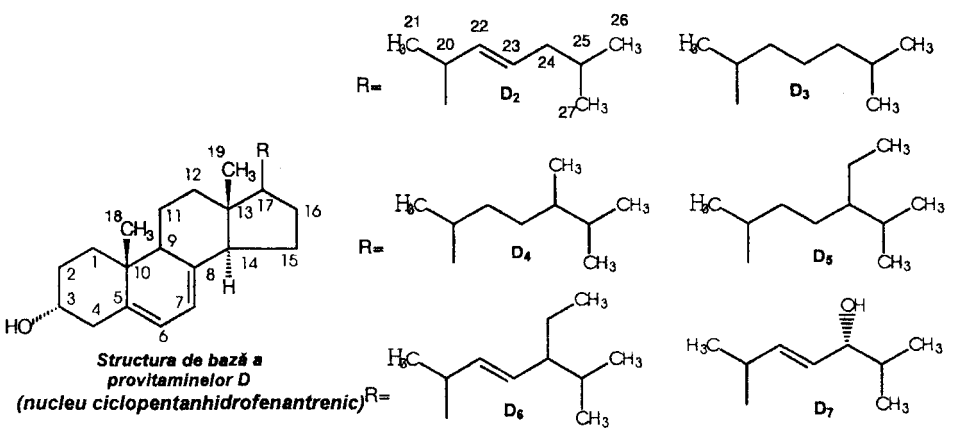


Fig.4.88. Structura vitaminelor D

Grupul vitaminelor D are șase componenți codificați notați D2 – D7. Atât proveniența cât și rolul acestor substanțe justifică mai puțin apartenența vitaminică. În cazul organismelor animale, colesterolul endogen este un precursor vitaminic. Rolul major jucat de vitaminele D privește metabolismul calciului și al fosforului, stările carențiale manifestându-se la copii prin rahitism iar la adulți prin osteomalacie, ambele fiind cauzate de procese defectuoase de calcefiere ale oaselor.

Toate vitaminele D provin din precursori sterolici, care posedă pe lângă nucleul ciclopentanhidrofenantrenic (*Fig. 4.88.*):

- un hidroxil în poziția 3
- două duble legături în pozițiile 5 și 7
- catenă laterală formată din 8 - 10 atomi de carbon, terminată printr-un rest izopropilic și
- câte un metil atașat în nucleu la pozițiile 10 și 13

provitaminele D sunt prezentate mai jos:

Provitamina	Denumirea
D_2	Ergosterol
D_3	7-dehidrocolesterol
D_4	22-dihidroergosterol
D_5	7-dehidrositosterol
D_6	7-dehidrostigmasterol
D_7	7-dehidrocampesterol

Trecerea de la provitamine la vitaminele D propriuzise se realizează sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, disponibile în radiația solară. De exemplu ergosterolul prezintă maxime de absorbție la 260, 270, 280 și 293 nm, cea mai eficace fiind cea de la 280 de nm. Procesul este o transpoziție sigmatropică [1,7] suprafacială decurgând prin intermediari previtaminici. (*Fig. 4.89.*).

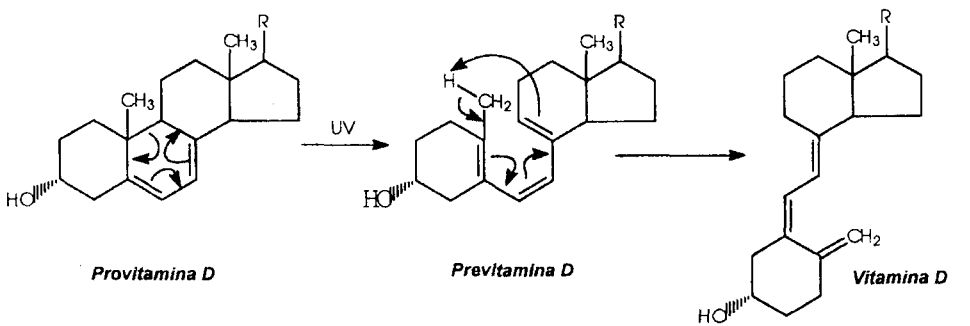


Fig. 4.89. Secvența trecerii de la provitamine D la vitaminele D

Cele mai abundente vitamine D sunt:

Vitamina D_2 sau *ergocalciferolul* (prefixul ergo- provine de la ergot sau cornul secarei, -*Claviceps purpureea*-, o ciupercă dăunătoare plantei, de unde a fost izolat prima dată ergsterolul sau provitamina D_2). Ergosterolul se mai găsește în cantități apreciabile ca sursă în drojdia de bere, precum și în ciuperca *Aspergillius niger*.

Vitamina D_3 sau *colecalciferolul* (prefixul cole- atestă proveniența din colesterol a provitaminei D_2 sau 7-dehidrocolesterol). Originea endogenă a colesterolului infirmă formal apartenența acestui grup de substanțe la familia vitaminelor.

După formarea vitaminelor D, acestea ajung la ficat. Cele provenite prin dietă se absorb la nivelul intestinului subțire proximal, de unde trec în circulația sangvină. Cele endogene, formate în piele ajung în ficat tot prin circulația sangvină. În ambele cazuri transportul se face prin intermediul unei proteine de legare a vitaminei D, **DBP** (de la Vitamin *D B*inding *P*rotein) sintetizată în ficat. Ea mai este cunoscută și sub numele de **transcalciferină.**

În ficat și în rinichi vitaminele D pot suferi succesiv o serie de hidroxilări care duc la compuși cu acțiune eficace (*Fig.4.90.*). Natura acestei acțiuni ne îndreptățește să încadrăm vitaminele D mai degrabă în clasa **prohormonilor** decât în cea a vitaminelor.

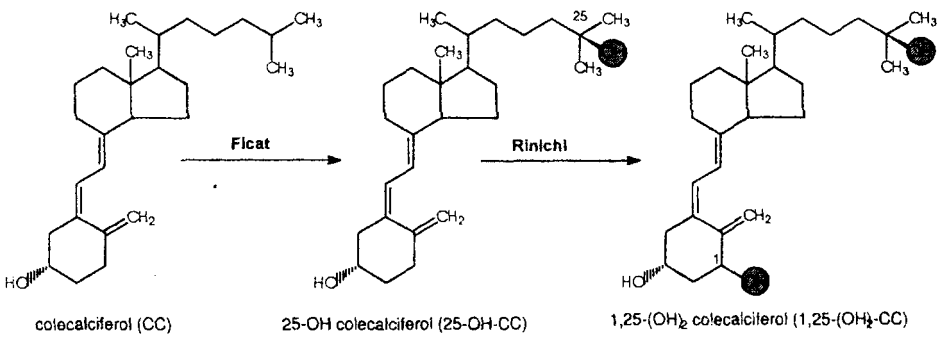


Fig.4.90.transformări prin hidroxilare ale colecalciferolului

Prima transformare, cea petrecută în microsomii hepatocitelor va consta într-o hidroxilare în poziția 25 cu formarea derivatului corespunzător **25(OH)D.** Numele sub care mai sunt cunoscuți acești derivați monohidroxilați ai calciferolilor este de **calcifedioli.** (în cazul colecalciferolului sau vitaminei D_3 se va forma 25-HO-colecalciferolul sau 25-OH-CC). Acest compus se va reîntoarce pe calea circulatorie. De acolo o parte va ajunge la rinichi. În rinichi se va realiza o nouă hidroxilare cu formarea **1,25 $(OH)_2D$** sau în cazul vitaminei D_3 (1,25-$OH)_2$-CC). Hidroxilaza renală este o monooxigenază localizată în membrana mitocondrială internă. Ea conține proteine Fe-S și este NADH,H^+ și citocrom P_{450} dependentă. Activitatea sa este supusă unui control prin inhibiție feed-back, concentrație de comutare a produsului (1,25 $(OH)_2D$) fiind 0,1 nM.

Dintre cei doi compuși hidroxilați, **1,25 $(OH)_2D$** are, în conjuncție cu doi hormoni, **calcitonina** și **hormonul paratiroidian** (PTH) un rol esențial în reglarea homeostaziei calciului și fosforului.

Calciul este un ion important în multe procese: contracție musculară, transmiterea impulsurilor nervoase, structura și funcțiile membranelor celulare, coagularea sângelui ș.a. Nivelul său trebuie să fie constant. Intrarea Ca^{2+} în organism se face prin absorbție intestinală. În organism, calciul se găsește în sistemul circulator, locul principal de detecție a variațiilor de concentrație. El se stochează în oase. Eliminarea se face pe cale renală. Realizarea homeostaziei calcice presupune acțiuni coordonate la nivelul absorbției și excreției sale. Astfel la scăderea calcemiei[50] vitamina D se transformă în 1,25 $(OH)_2D$, forma activă care va acționa la nivelul intestinului pentru creșterea intensității absorbției. De asemenea vitamina D activă, împreună cu PTH acționează la nivelul oaselor pentru a crește absorbția calciului. În cazul unei hipercalcemii, **calcitonina** amplifică excreția renală a calciului împiedicând mobilizarea acestuia din oase, blocând în același timp activarea vitaminei D și secreția hormonului paratiroidian. Acțiunea vitaminei D asupra fosforului se realizează indirect prin acțiunea sa asupra calciului.

4.4.4.2.3. Vitaminele E

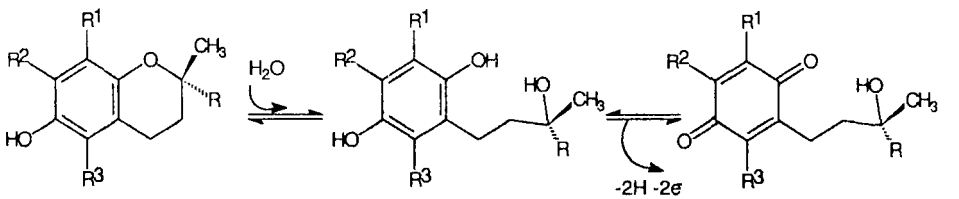


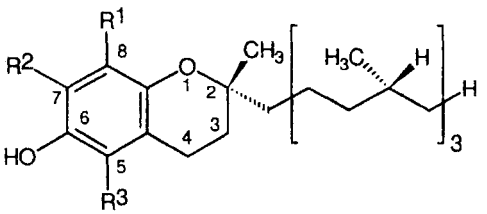
Fig.4.91. Manifestarea caracterului antioxidant al vitaminelor E

Sunt cunoscute ca produși cu acțiune antioxidantă (*Fig.4.91.*), a căror activitate fiziologică la mamifere constă în creșterea fertilității. Numele sinonim de **tocoferoli**, sub care acestea sunt cunoscute are etimologie greacă: (*tokos* – a naște, *phero* – a putea). Se cunosc șapte termeni (*Fig.4.92.*) numiți cu α–, β–, γ–, δ–, ε–, ζ–, și η– tocoferol. Structura lor este caracterizată prin prezența unui nucleu cromanic substituit.

Caracteristic este prezența hidroxilului în poziția 6, de asemenea a metilului din 2, alături de o catenă hidrocarbonică de origine triizoprenică, saturată pentru tocoferolii (α, β, γ și δ și η – *Fig.4.92.*) și nesaturată pentru tocoferolii ε (R_1 și $R_3 = CH_3$ iar $R_2 = H$) și ζ (R_1, R_2 și $R_3 = CH_3$). Sursele cele mai importante sunt cele vegetale, extracția făcându-se cu

[50] Sufixul **–emie** desemnează valoarea unui parametru în sânge, după cum **–urie** se referă la urină.

eter, benzen sau acetonă. Compușii nesaturați (ε și ζ) sunt mai rar întâlniți.



Vitamina E	R1	R2	R3
tocoferol α	CH_3	CH_3	CH_3
tocoferol β	CH_3	H	CH_3
tocoferol γ	H	CH_3	CH_3
tocoferol δ	CH_3	H	H
tocoferol η	H	CH_3	H

Fig. 4.92. Structura vitaminelor E cu catenă triizoprenică ssaturată

Chimic, vitaminele E sunt relativ stabile în mediu acid, dar instabile în mediu alcalin. Formele comerciale sunt folosite în special ca esteri, prin acilarea hidroxilului 6 în special cu acidul palmitic. Prin aceasta se mărește mai mult lipofilicitatea substanței, implicit viteza de acces transmembranar.

Biochimic, rolul imediat al vitaminelor E este acela antioxidant pe de o parte și apoi acela de stabilizator membranar. Rolul antioxidant al tocoferolilor este determinat de prezența hidroxilului din poziția 6 a cromanului substituit, care permite prin oxidare succesivă hidrolizei legăturii eterice 1–2–formarea unui intermediar chinonic (*Fig.4.91.*) Această oxidare „sinucigașă" protejează de oxidare alte substanțe bioactive precum acizii grași nesaturați, vitamina A, carotenoizii și grupările tiolice. Mecanismele concrete de oxidare sunt încă insuficient cunoscute. Rolul protector se manifestă în special la nivelul membranelor, unde se găsește ancorat prin catena hidrocarbonică.

4.4.4.2.4. Vitaminele K

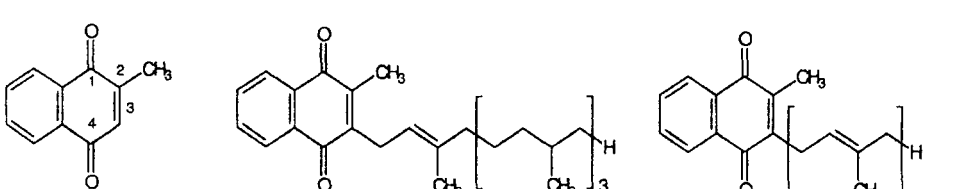


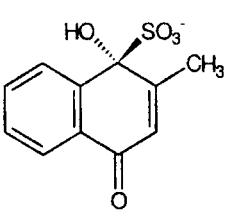
Fig.4.93. Vitaminele K_1, K_2 și K_3

Sunt cunoscute ca vitamine antihemoragice și prezintă ca o caracteristică generală o structură 2-metil 1,4 naftochinonică. Structura de ba-

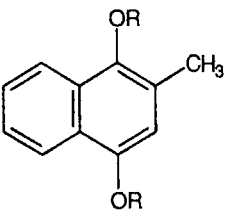
ză, **vitamina K_3** sau menadiona nu este un compus natural, el producându-se sintetic la scară mare. **Vitamina K_1** (filochinona) și **vitaminele K_2** (menachinone sau farnochinone) posedă catene laterale izoprenoidice saturate sau nu, atașate de carbonul 3.

Vitamina K_1 a fost obținută prima dată din lucernă prin extracție cu eter de petrol urmată de purificare pe cărbune. În poziția 3 conține o catenă de 20 de atomi de carbon fragmentul purtând numele de fitil (de la alcoolul corespunzător fitolul).

Vitaminele K_2 diferă între ele prin numărul resturilor izoprenice atașate la carbonul 3. Cea mai răspândită formă este vitamina K_2 (n=7) identificată abundent în intestinul gros al mamiferelor. De asemenea s-au identificat vitamine K_2 (menachinone) cu 4,6,8,9,10 resturi izoprenice (*Fig.4.93*).



Vicasol



Vitamine K_4

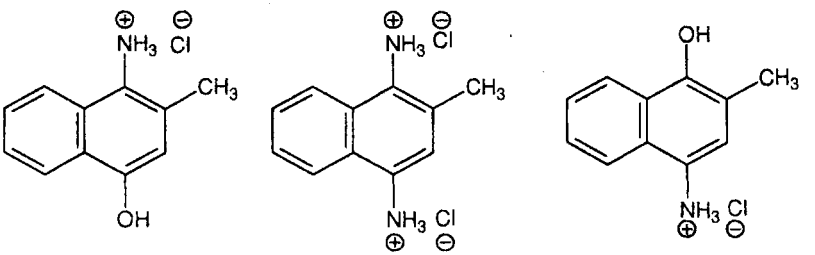
R	Vitamina K4
H	menadiol
Acetil	acetilmenadiol
Succinat	succinilmenadiol
Sulfonat	sulfonilmenadiol

Fig.4.94. Forme sulfonice și esterice ale vitaminelor K de sinteză

Implicațiile terapeutice majore, ca agenți de coagulare ai vitaminelor K, au făcut necesare obținerea unor analogi de sinteză ai acestora, deoarece s-a constatat că alternativa chimică este competitivă economic cu cea a extracției din surse naturale. În plus, acești analogi au structură mai simplă, fotosensibilitate mai redusă, iar activitatea biologică este comparabilă cu a analogilor naturali. Slaba solubilitate a compușilor se rezolvă fie utilizând aducții bisulfitici (cazul aductului bisulfitic al menadionei, Vicasolul), fie folosind derivații reduși ai formei naftochinonice (vitaminele **K_4** (*Fig.4.95.*)). În acest caz grupările hidroxil se pot acila formându-se acetil-, succinil-, butiril- sulfonil- menadiolii. Prin acilare, fie se mărește solubilitatea (derivații succinil, sulfonil), fie se mărește lipofilicitatea (derivații butiril, acetil)

Mai există vitamine K de sinteză care posedă grupări aminice. Acestea prezintă avantajul că prin trecerea lor în săruri clorhidrați, sulfați, solubilitatea lor crește puternic, potențialul redox modificându-se relativ puțin. Cele mai cunoscute sunt vitaminele K_5, K_6 și K_7. (*Fig.4.95*)

Așa după cum s-a arătat, rolul major al vitaminelor K este intervenția lor în mecanismele coagulării.



Vitamina K_5 **Vitamina K_6** **Vitamina K_7**

Fig.4.95. Forme clorhidrat ale unor structuri vitaminice K de sinteză

Coagularea sângelui este un proces prin care organismul frânează hemoragiile. El constă dintr-o succesiune de reacții proteolitice la care participă cel puțin șapte enzime proteolitice. Acestea există sub formă inactivă, de zimogeni[51]. După excizia porțiunii inhibitorii din catenă de către o enzimă specifică pentru zimogenul respectiv, acesta devine o enzimă proteolitică activă pentru alt zimogen. În acest mod se realizează o amplificare a semnalului dat de rănirea unui țesut, amplificare care culminează cu formarea de cheaguri care obturează vasele afectate împiedicând hemoragia.

Cheagurile de sânge sunt formațiuni rezultate prin excizia unor fragmente (fibropeptide) din fibrinogen. Fibrinogenul este un diheterotrimer format din trei tipuri de catene $(A\alpha)_2(B\beta)_2\gamma_2$. Sub acțiunea trombinei, rezultă ***fibrina*** un diheterotrimer cu structura $(\alpha\beta\gamma)_2$ și două fibropeptide: A (fiecare cu câte 18 aminoacizi), respectiv două fibropeptide B (cu câte 20 aminoacizi). Cele două tipuri de fibropeptide sunt bogate în acizi aspartic și glutamic precum și în resturi de tirozină sulfatată, ceea ce le conferă un caracter anionic. În fibrinogen, participarea catenelor A și B provoacă repulsia intercatenară și explică solubilitatea agregatului oligomeric. Prin excizia fragmentelor A și B, solubilitatea scade mult. Formarea cheagurilor se desăvârșește printr-o serie de reacții intercatenare de transamidare între resturi de glutamină și lisină, aparținând fragmentelor de fibrină (*Fig.4.96. A*).

[51] Componentele proteice inactive (zimogenii) și active se numesc factori. Cifrele romane care denumesc factorii sunt cele stabilite în funcție de data descoperii lor.

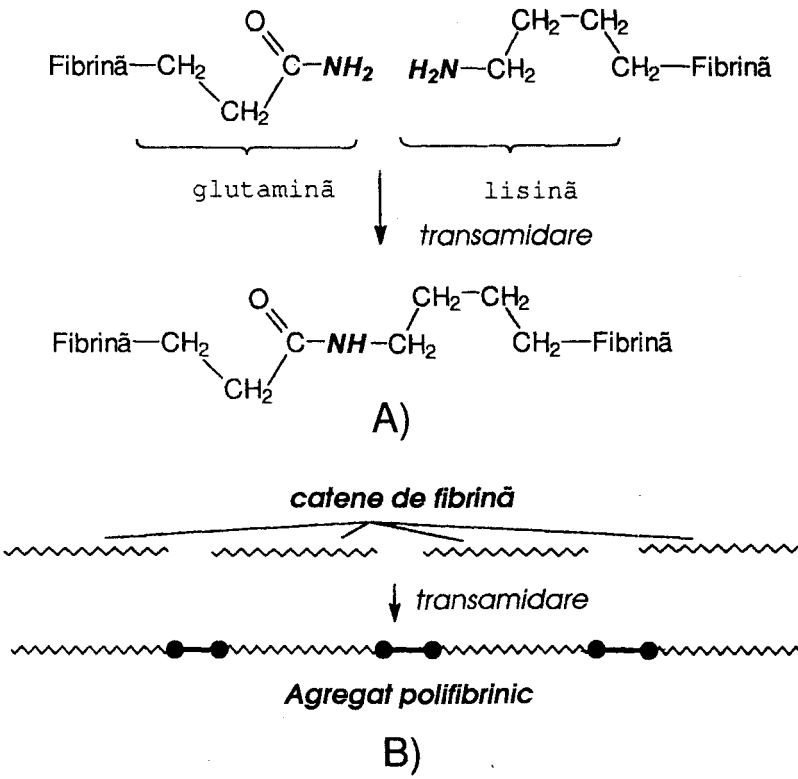


Fig.4.96 Mecanismul reticulării fibrinei

Multitudinea reacțiilor de reticulare fac din resturile de fibrină un agregat insolubil (*Fig.4.96.B.*) Aceasta duce la formarea unor agregate insolubile cu masă moleculară mare. Reacția respectivă este catalizată de o *transglutaminază* (factor stabilizator al fibrinei -FXIII-). *Fig.4.97.*

Există două modalități de declanșare a cascadei de reacții proteolitice care culminează cu formarea fibrinei reticulate (a cheagurilor de sânge) (*Fig. 4.97.*):

Modalitatea (calea) intrinsecă de activare a coagulării. La contactul direct cu colagenul din vasele sangvine, contact care se poate realiza doar în cazul în care vasele sunt rănite, sau în contactul cu alte tipuri de suprafețe, are loc activarea **factorului XII** (HAGEMAN). Acesta, odată activat, pe de o parte activează prin proteoliză **prekalicreina,** la **kalicreină** care generează noi cantități de **factor XIIa**[52] iar pe de altă parte activează **factorul XI**, care la rândul său activează **factorul IX**, iar acesta

[52] Indicele a desemnează forma activată (capabilă de proteoliză a factorului corespunzător.

la rândul său îndepărtează peptida care maschează **factorul X** (STUART). Trebuie subliniat că declanşarea succesiunii de evenimente, este dependentă de legarea a patru factori proteici de suprafeţele specifice: **factorul XII, prekalicreina (PK), kininogenul** de masă mare şi **factorul XI** sau Rosenthal. Dacă factorul XII se leagă direct, prekalicreina şi factorul Rosenthal se leagă prin intermediul kininogenului de masă mare.

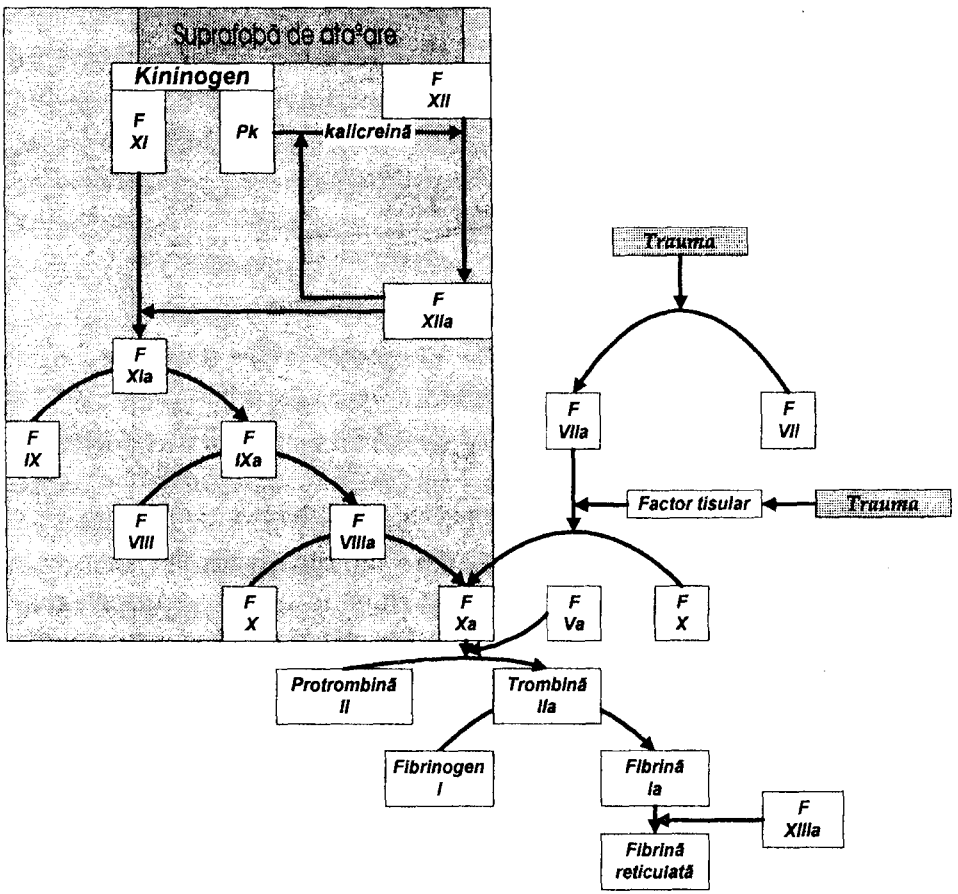


Fig.4. 97. Succesiunea prin care are loc formarea fibrinei

Succesiunea factorilor proteici este **XII → XI → IX → X** (*Fig. 4.97.*). La **factorul X** se face joncţiunea cu **calea extrinsecă** a cărei declanşare este realizată de către factorii eliberaţi de ţesutul traumatizat. Aceştia activează **factorul VII** şi eliberează din vasele sangvine o lipoproteină numită **factor tisular, care** împreună cu **factorul VIIa** se activează **factorul X.**

Factorul Xa la rândul său, transformă protrombina inactivă în trombină (**Factorul II**), care catalizează excizia proteolitică a fibropeptidelor A și B.

Vitamina K este un cofactor indispensabil în procesul de activare a **factorilor II, VII, IX și X**, care intervin în etapele finale ale coagulării. Acțiunea sa constă în participarea la procesul de carboxilare a unor resturi de acid glutamic (**Glu**) la acid γ-carboxiglutamic (**Gla**). Aceste resturi sunt plasate la capătul C-terminal al catenei peptidice. La acest proces vitamina K participă sub formă hidrochinonică (redusă) – *Fig.4.98.*:

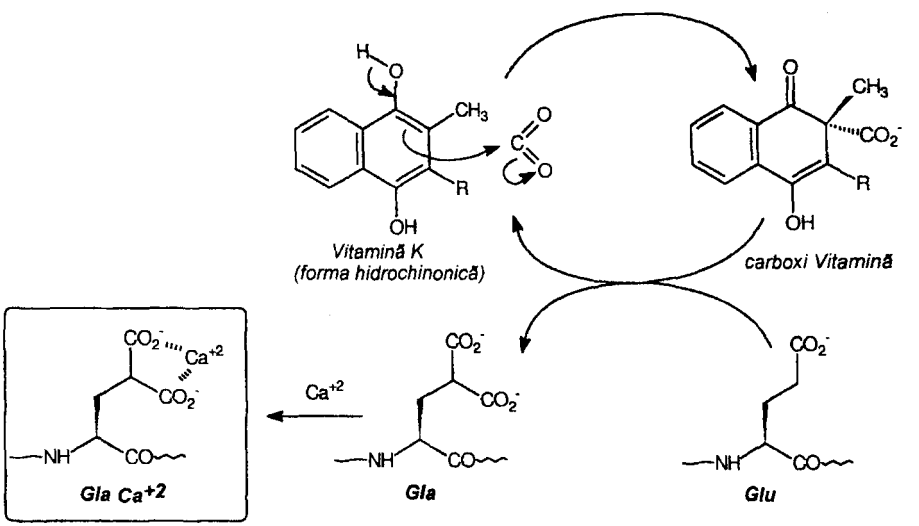


Fig.4.98. Mecanismul participării vitaminei K la procesul coagulării

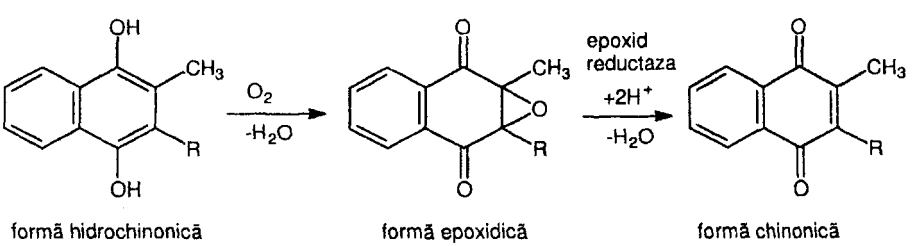
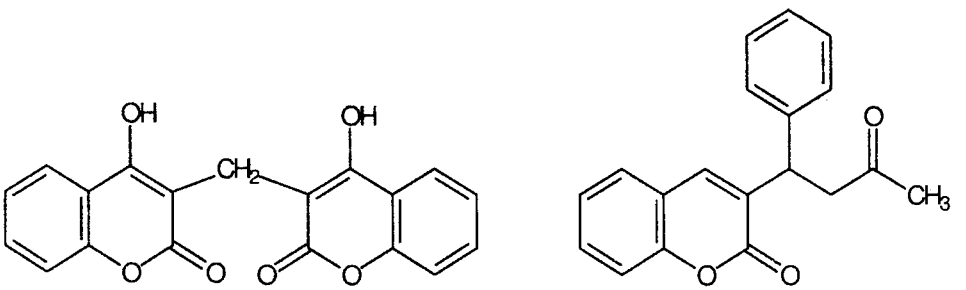


Fig. 4.99. Regenerarea formei active a vitaminelor K

Activarea protrombinei prin carboxilare și legarea calciului, este esențială pentru atașarea acesteia de zonele anionice ale fosfolipidelor din membranele plăcuțelor sangvine. În acest mod se facilitează acțiunea proteolitică factorului X activat, pe protrombina astfel fixată. Car-

boxiglutamatul (Gla Ca^{2+}) leagă calciul cu afinitate mai mare decât glutamatul. Prin aceasta va crește intensitatea interacțiunii specifice protrombină - Ca^{2+} - fosfolipide, care este esențială în procesul de coagulare.



dicumarol warfarina

Fig.4. 100. Antagoniști ai vitaminelor K, cu acțiune hemoragică

Reoxidarea formei hidrochinonice utilizate la transportul dioxidului de carbon se face prin intermediul unui derivat epoxidic format în prezența oxigenului (*Fig.4.99.*). Acest derivat epoxidic trece, prin acțiunea unei epoxid reductaze, în derivatul chinonic.

Unii antagoniști de tip cumarinic, naturali precum **dicumarolul**, sau de sinteză, precum **warfarina**, (*Fig.4.100.*) prin împiedicarea legării calciului pe trombină, blochează coagularea sângelui și în consecință produc hemoragii fatale. Acțiunea antagoniștilor prezentați se bazează pe similitudinea structurală cu vitaminele K, ceea ce sugerează un mecanism competitiv de acțiune.

4.5. Enzime multimerice

Ca proteine, enzimele pot poseda structură cuaternară. Complexitatea structurii este mare la enzimele intracelulare și mai redusă la enzimele destinate exportului în spațiile extracitosolice. În afara celulei, variabilitatea condițiilor locale de mediu poate denatura cu atât mai ușor edificiul proteic cu cât acesta are un grad mai mare de organizare. Enzimele extracelulare sunt de regulă monocatenare.

Existența subunităților (monocatenare) la proteinele multimerice face posibilă modularea activității enzimatice prin interacțiuni suplimentare atât între subunități, cât și cu substanțe specifice-modulatorii.

Interacțiunile suplimentare dintre subunități stau la baza efectelor de cooperativitate care constau în modificarea afinității unui situs pentru un anume substrat atunci când are loc atașarea unui ligand (substrat sau altă substanță) pe alt situs – vezi reglarea activității enzimatice.

Subunitățile enzimelor multimerice pot fi identice precum în cazul aldolazei sau sunt diferite precum în cazul aspartat transcarbamilazei. Pe o catenă există de regulă un singur situs catalitic. Excepția de referință este ADN polimeraza I care acționează în procesul de transcriere (vezi Vol. II), care pe o singură monocatenă posedă trei situsuri catalitice distincte: un situs polimerazic, unde are loc formarea unei legături fosfodiesterice și două situsuri exonucleazice.

Enzimele multimerice pot cataliza o reacție sau mai multe reacții biochimice. În ultimul caz, atunci când fiecare catenă poate fi asociată unei activități catalitice distincte putem vorbi despre *complexe enzimatice.* Reacțiile catalizate de complexele enzimatice se desfășoară într-o succesiune proprie unei anume căi metabolice, complexul enzimatic facilitând circulația ordonată a intermediarilor de reacție între situsurile unde au loc transformările.

In majoritatea cazurilor fiecare reacție este catalizată de o anumită enzimă. Regula își are excepția prin existența *izoenzimelor,* enzime diferite care realizează aceleași activități însă diferă prin localizare, prin distribuția în diferite organe, prin vârsta organismului, finalmente prin parametrii cinetici specifici.

Ca exemplu, la om, se pot cita existența a două **malat dehidrogenaze**: una citoplasmatică și una mitocondrială; **piruvat kinaza** poate exista în patru forme: L (hepatică), R (eritrocitară), M_2 (fetală), și M_1 (în mușchi, creier). Forma M_2 este treptat înlocuită în creier, și mușchi cu forma M_1. Dintre toate aceste forme M1 nu este reglată alosteric (vezi reglarea activității enzimatice). Un alt exemplu clasic este lactatdehidrogenaza. Această enzimă, tetramerică, ilustrează o modalitate interesantă de structură realizată prin combinarea în proporții diferite a două tipuri de catene monomerice H și M. Se cunosc cinci izoenzime date cu compoziția lor, în ordinea creșterii sarcinii pozitive LD_1 (H_4), LD_2 (H_3M), LD_3 (H_2M_2), LD_4 (HM_3) și LD_5 (M_4).

Aceste enzime se găsesc in ser dar semnificația fiziologică a concentrației lor nu este însă cunoscută. Unele abateri de la compoziția „ideală" în izoenzime pot fi atribuite pe baze pur statistice unor tulburări funcționale. De exemplu, în infarctul miocardic, în unele afecțiuni renale, în leucemie, se constată că $LD_1 > LD_2$.

4.6. Abzime

Așa după cum s-a prezentat la subcapitolul 4.4. mecanisme de acțiune enzimatică, principiul de realizare al actului catalitic de către enzime, constă în legarea substratului, și în stabilizarea stării de tranziție proprii substratului. Utilizând-se capacitatea de legare a anticorpilor[53], se poate realiza o enzimă artificială, atunci când anticorpul este generat de o substanță analogă a stării de tranziție a unei anume reacții.

În acest mod, anticorpii, produși ca răspuns la acțiunea unui antigen potrivit, pot mări viteza unei reacții chimice precum și selectivitatea acesteia la valori comparabile enzimelor consacrate. Noii catalizatori au primit numele de abzime, de la *ab*ody și en*zyme.*

Obținerea abzimelor constă în mai multe etape. În primul rând se sintetizează analogul stării de tranziție al reacției care trebuie catalizate. Apoi, acest analog, de regulă o substanță cu masă molară relativ redusă, deci fără capacitate imunogenetică, se va transforma în într-un imunogen prin atașarea chimică a unei catene polipeptidice purtătoare, de regulă albumină serică bovină. Prin aceasta, haptena[54] (substanța inițial sintetizată) va deveni antigen, deci va avea capacitatea de a iniția sinteza de anticorpi. Antigenul va fi injectat în reprize unui animal, de regulă șoarece, care va produce anticorpii doriți. Din antiserul obținut se vor separa anticorpii, care, întocmai ca și enzimele, vor putea fi utilizați pentru biotransformarea substraturilor.

Analogul stării de tranziție, haptena, este înzestrată cu capacitatea de a induce formarea unui anticorp care va poseda situsuri (paratopi) cu o topologie și o structură electronică utilă actului catalitic.

Primele experimente de utilizare catalitică a anticorpilor au fost extrem de laborioase. Reducerea efortului experimental a fost realizată abia după ce s-au pus la punct metodele de obținere a anticorpilor monoclonali (vezi Cap.3 la secțiunea anticorpi) precum și a celor de separare efectivă a anticorpilor (utilizând în special cromatografia de afinitate).

---

[53] Linus Pauling afirma în anii 1940 că „anticorpii leagă molecule iar enzimele leagă stări de tranziție". Pentru tratarea cantitativă a legării enzimelor de substrat vezi mecanismul reactiilor enzimatice.

[54] Haptena este capabilă să se lege de un anticorp preexistent dar este incapabilă de anticorpogeneză.

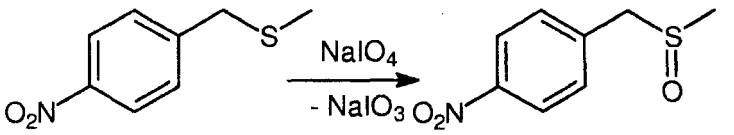
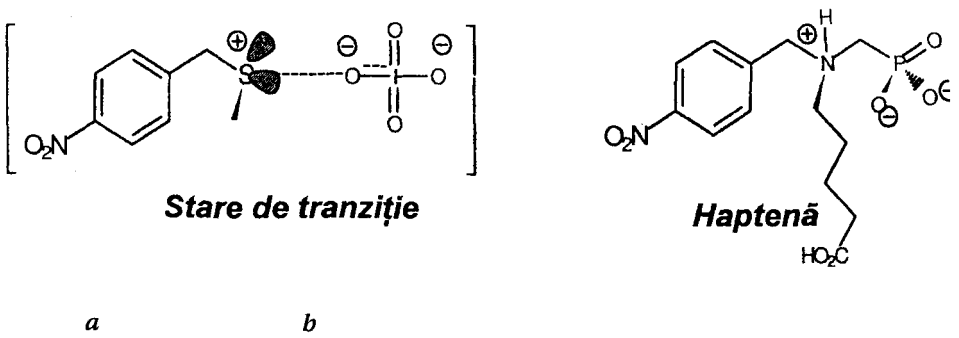


Fig. 4.101. Oxidarea sulfurii la sulfonă, catalizată abzimatic

De exemplu abzima codificată 28B4 catalizează oxidarea cu periodat de potasiu a 1-metilsulfanilmetil–4-nitro-benzenului la sulfoxidul corespunzător, conform reacției din *Fig. 4.101.*

Starea de tranziție pentru reacția obiect are structura prezentată în *Fig. 4.102 a.* Prin analogie cu această stare de tranziție s-a proiectat haptena corespunzătoare, cu ajutorul căreia s-a obținut anticorpul (abzima 28B4). Proiectarea haptenei a trebuit să țină seama de necesitatea stabilizării sarcinilor negative pe cei doi atomi de oxigen din periodat, respectiv a sarcinii pozitive de pe atomul de sulf. Ca model s-a ajuns la derivatul aminofosfonic din *Fig. 4.102. b.*

În urma imunizării realizată pe șoarece s-au obținut mai multe tipuri de anticorpi monoclonali, a căror afinitate pentru substrat precum și eficiență catalitică prezentau o plajă largă de valori.



a *b*

Fig. 4.102. Proiectarea haptenei pe modelul stării de tranziție a reacției catalizate

Anticorpul (abzima) 28B4 prezintă Kd ≈ K_M = 52 nM, respectiv k_3/K_M = $190 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$, parametri catalitici remarcabili.

Pe lângă reacțiile de oxidare, de tipul celui mai sus prezentate, au fost sintetizați o serie întreagă de abzime, care catalizează o paletă mare de reacții: hidrolize, izomerizări cis-trans, decarboxilări, transpoziții sigmatropice, cicloadiții etc. Numărul abzimelor este, după numărul în continuă creștere al publicațiilor care le descriu, în continuă creștere.

4.7. Noțiuni de cinetică enzimatică

4.7.1. Modelul michaelian, parametri

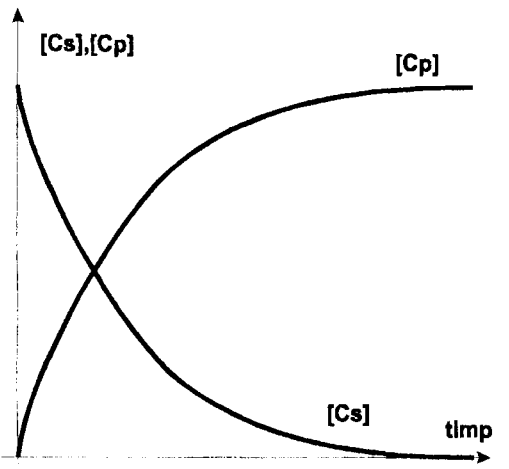


Fig. 4.103. Dinamica concentrației substratului și a produsului

Reacțiile enzimatice sunt în cele din urmă reacții chimice. De aceea, evoluția lor în timp, precum și factorii care influențează această evoluție pot fi urmăriți după principiile cineticii clasice. Cinetica enzimatică poate fi utilă, ca și cinetica chimică clasică de altfel, în elucidarea unor mecanisme de reacție, în calculul timpului de reacție, al conversiilor, al condițiilor optime economice, când se urmărește producția industrială, în bioreactor.

Pentru o reacție enzimatică simplă:

$$S \xrightarrow{\text{Enzimă}} P$$

dinamica Cs (concentrația substratului) și a Cp (concentrația produsului) au alura prezentată în *Fig. 4.103*:

Studiindu-se influența concentrației substratului asupra vitezei inițiale a reacției enzimatice, s-a relevat pentru viteza reacției enzimatice, o curbă cu alură hiperbolică, de tipul celei prezentate în *Fig. 4.104*. Analizând comportamentul sistemului de reacție, s-a constatat că:

1. la concentrații scăzute ale substratului, viteza de reacție este proporțională cu Cs (reacție de ord I)
2. la concentrații ridicate ale substratului viteza de reacție este independentă de acesta (reacție de ord 0).

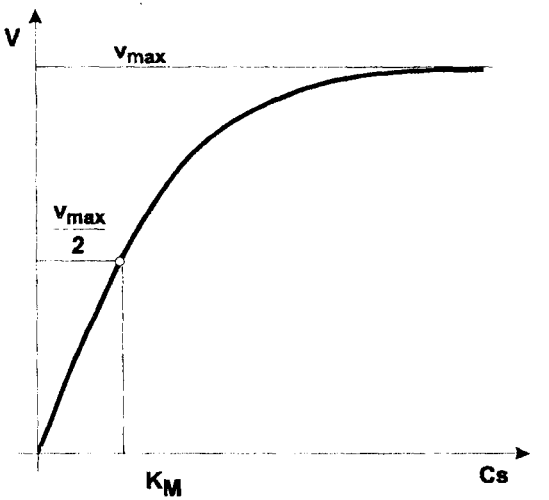


Fig. 4.104. Variația vitezei de reacție cu concentrația inițială a substratului

3. există o plajă a concentrației de enzimă la care viteza maximă depinde liniar de C_E (concentrația de enzimă).

Pe baza acestor observații, **HENRY**, propune în anul 1902 un model empiric pentru dependența vitezei reacției enzimatice de concentrația de substrat (C_S):

$$V = \frac{V_{max}\, C_S}{K_M + C_S} \qquad [4.9.]$$

Acest model empiric verifică observațiile făcute asupra influenței concentrației de substrat asupra vitezei reacției. Mărimile v_{max} și K_M sunt parametri care se determină experimental. Asupra lor vom reveni.

BROWN, propune tot în 1902, un mecanism general potrivit căruia inițial se formează, într-o reacție reversibilă, un complex enzimă-substrat ES, care se transformă ireversibil în produs de reacție, cu regenerarea enzimei:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

Implicarea complexului enzimă-substrat în mecanismul reacției enzimatice a fost făcută înainte de cunoașterea naturii chimice a enzimelor precum și înainte de detecția spectrofotometrică a complecșilor enzimă-substrat. La baza mecanismului propus de BROWN a stat teoria lacăt-cheie a interacțiunii enzimă-substrat. Această teorie explică interacțiunea enzimă - substrat prin stereocomplementaritatea statică a zonelor de contact din enzimă și substrat. Astăzi această teorie este în-

locuită cu teoria adaptării induse care afirmă că interacțiunea primară presupune o adaptare reciprocă a geometriilor partenerilor de reacție.

Dintre ipotezele suplimentare introduse de BROWN citãm:

1. Concentrația totală de enzimă rămâne constantă în timpul reacției enzimatice, adică enzima inițială se va regăsi atât sub formă de complex enzimă – substrat, cât și ca enzimă liberă: $C_{E0} = C_E + C_{ES}$ [4.10]

2. Concentrația de enzimã este mult mai micã decât cea de substrat, prin urmare, formarea complexului enzimă - substrat nu va modifica semnificativ concentrația substratului.

3. Concentrația de produs este considerată suficient de mică, pentru a nu produce inhibiție.

Fig. 4.105. Lenor MICHAELIS și Maude MENTEN

MICHAELIS și MENTEN introduc în 1913 ipoteza conform căreia, viteza de formare a produsului (din complexul enzimă – substrat) este mult mai mică decât viteza de asociere - disociere a enzimei și substratului. De aceea, etapa limitantă de viteză este reacția de formare a produsului. În plus, se poate defini o constantă de disociere a complexului

$$\text{ES: } K_S = \frac{C_E \cdot C_S}{C_{ES}} = \frac{k_2}{k_1} \qquad [4.11.]$$

În 1925, **BRIGGS** și **HALDANE** au emis ipoteza de staționaritate, potrivit căreia concentrația complexului enzimă - substrat atinge rapid o valoare constantă în dinamica sistemului; cu alte cuvinte viteza de formare a acestuia poate fi considerată egală cu viteza sa de descompunere, ceea ce formal se transcrie ca:

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = 0 \qquad [4.12]$$

Elaborarea modelului evoluției vitezei de reacție în funcție de concentrația de substrat se poate face ținând cont de ipoteza MICHAELIS și MENTEN (1) sau de ipoteza BRIGGS -HALDANE (2).

$$\frac{dC_P}{dt} = -\frac{dC_S}{dt} = k_3 C_{ES} \qquad [4.13]$$

Din echilibrul primei reacții și din valoarea redusă a k_3 comparativ cu k_2 rezultă:

$$k_1 C_S \cdot C_E = k_2 C_{ES} \qquad [4.14]$$

Eliminând mărimea C_E, dificil de determinat experimental, între ecuațiile [4.14] și [4.10] se obține expresia concentrației complexului enzimă-substrat:

$$C_{ES} = \frac{C_{E_0} \cdot C_S}{\frac{k_2}{k_1} + C_S} \qquad [4.15]$$

Introducând această valoare în expresia [4.13], se obține expresia vitezei de reacție:

$$v = \frac{dC_P}{dt} = -\frac{dC_S}{dt} = \frac{k_3 C_{E_0} \cdot C_S}{\frac{k_2}{k_1} + C_S} = \frac{V_{max} \cdot C_S}{K_M + C_S} \qquad [4.16]$$

În această expresie valoarea K_M este egală cu constanta de disociere a complexului enzimă substrat. K_M poartă numele de constanta MICHAELIS, iar ecuația model este cunoscută sub numele de ecuația sau modelul MICHAELIS–MENTEN în onoarea muncii de pionierat a celor doi cercetători.

Ipoteza de staționaritate BRIGGS–HALDANE permite o abordare cantitativă mai exactă, deoarece la evaluarea dinamicii concentrației complexului enzimă substrat ține seama de toate cele trei reacții pe care aceste le poate suferi:

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = k_1 C_E C_S - k_2 C_{ES} - k_3 C_{ES} \approx 0 \qquad [4.17]$$

de aici, eliminând concentrația momentană a enzimei, C_E în conformitate cu ec. [4.10] rezultă valoarea concentrației staționare a complexului ES:

$$C_{ES} = \frac{k_1 \cdot C_{E_0} \cdot C_S}{k_2 + k_3 + k_1 \cdot C_S} \qquad [4.18]$$

Introducând această valoare în expresia vitezei de reacție (ec.4.13) se obține:

$$v = \frac{dC_P}{dt} = -\frac{dC_S}{dt} = \frac{k_3 C_{E_0} \cdot C_S}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + C_S} = \frac{V_{max} \cdot C_S}{K_M + C_S} \qquad [4.19]$$

comparând expresiile vitezelor de reacție descrise de ec. [4.16] și [4.19] constatăm că diferența constă în termenul k_3 care apare în constanta K_M.

K_M oferă o idee asupra afinității enzimei față de substrat. Dimensiunea sa este de concentrație, iar semnificația sa este de concentrație de substrat la care se atinge jumătate din valoarea maximă a vitezei de reacție. Determinarea experimentală a valorii sale trebuie realizată în zona optimului de pH și temperatură (vezi mai departe). Pentru majoritatea sistemelor enzimatice valoarea lui K_M este foarte apropiată de cea a constantei de disociere a complexului enzimă-substrat ES (dată fiind valoarea mică a k_3 comparativ cu k_2.). Excepțiile care apar se datorează diferențelor între concentrația de substrat în vecinătatea situsului catalitic și în vecinătatea enzimei. Cu alte cuvinte K_M real trebuie să reflecte concentrația de substrat accesibilă la situsul catalitic, ori experimental este disponibilă doar concentrația de substrat în exteriorul enzimei.

Abateri mari se observă în cazul enzimelor membranare, când datorită difuziei în vecinătatea imediată a enzimei (a situsului catalitic) concentrația reală de substrat este mai redusă decât cea determinată experimental, constanta experimentală având deci o valoare superioară celei reale. Același tip de abatere se poate observa și în cazul enzimelor imobilizate.

Un caz cinetic particular apare atunci când etapa de formare a produsului din complexul enzimă - substrat este reversibilă. Aceasta corespunde modelului:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

În conformitate cu ipoteza de staționaritate:

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = k_1 C_E C_S - k_2 C_{ES} - k_3 C_{ES} + k_4 C_E C_P = 0 \qquad [4.20]$$

Urmând raționamentul precedent se obține:

$$C_{ES} = \frac{k_3 \cdot C_{E_0} \cdot (k_1 C_S + k_4 C_P)}{(k_2 + k_3) + k_1 \cdot C_S + k_4 C_P} \qquad [4.21]$$

De aici, viteza de reacție pentru procesul reversibil în ambele etape:

$$v = \frac{dC_P}{dt} = -\frac{dC_S}{dt} = \frac{C_{E_0} \cdot (C_S - \frac{k_4 \cdot k_2}{k_3 \cdot k_1} C_P)}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + C_S + \frac{k_4}{k_1} C_P} \qquad [4.22]$$

dacă anulăm valoarea constantei k_4, ec.[4.22] își va modifica forma ajungându-se la ec. [4.19] sau [4.9].

Cel mai des utilizat model pentru cinetica enzimatică monosubstrat este modelul MICHAELIS MENTEN, cunoscut și sub numele sinonim de model michaelian, descris de ecuația [4.16], sau [4.9].

Cunoscând concentrațiile inițiale ale partenerilor de reacție, precum și constantele de reacție k_1, k_2 și k_3, modelul matematic descris de ecuațiile:

$$\frac{dC_P}{dt} = k_3 \cdot C_{ES}$$

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = k_1 C_E C_S - k_2 C_{ES} - k_3 C_{ES}$$

$$\frac{dC_S}{dt} = k_2 C_{ES} - k_1 C_S C_E$$

$$\frac{dC_E}{dt} = k_2 C_{ES} - k_1 C_E C_S + k_3 C_{ES} \qquad [4.23]$$

poate fi rezolvat pe calculator cu un program de integrare numerică ușor de realizat într-unul din programele accesibile ca MATLAB, MATHCAD, MATHEMATICA ori MAPLE.

O astfel de rezolvare necesită cunoașterea celor trei constante de viteză, dificil de determinat experimental.

Modelul MICHAELIS - MENTEN poate fi rezolvat relativ simplu, prin determinarea parametrilor K_M, respectiv v_{max}. Desigur, prin reprezentarea vitezei de reacție (inițiale pentru ca substratul să fie în exces) în funcție de diferite valori ale concentrației substratului se obține o curbă cu alura celei din *Fig. 4.98*, pe care se pot identifica geometric K_M și v_{max}.

Metoda analitică este mai precisă, de aceea, prin liniarizarea ecuației [4.9] parametrii pot fi deja determinați prin metoda celor mai mici pătrate. Se utilizează curent trei metode de liniarizare:

1. Modelul Lineaweaver - Burk

prin inversarea ecuației [4.9] se obține expresia [4.24.]:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{C_S} \qquad [4.24]$$

Această expresie conține variația liniară a inversului vitezei cu inversul concentrației substratului. Ordonata la origine a curbei Lineaweaver - Burk este $1/v_{max}$, iar panta este K_M / v_{max}. Intersecția cu abscisa se face în punctul $-1/K_M$.

2. Modelul Langmuir

prin multiplicarea ambilor temeni ai expresiei Lineaweaver - Burk cu C_S se obține:

$$\frac{C_S}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} + \frac{C_S}{v_{max}} \qquad [4.25]$$

Forma ecuației obținute [4.25], este similară ecuației cu același nume utilizată pentru studiul adsorbției gazelor pe solide. Expresia este liniară cu C_S. Ordonata în origine este K_M/v_{max}, panta $1/v_{max}$, iar intersecția cu abscisa $-K_M$.

3. Modelul Eadie - Hofstee

prin multiplicarea ambilor termeni ai ecuației de definiție a vitezei de reacție [4.9] cu Km + C_S, urmată de rearanjarea termenilor se obține:

$$v = v_{max} - K_M \cdot \frac{v}{C_S} \qquad [4.26]$$

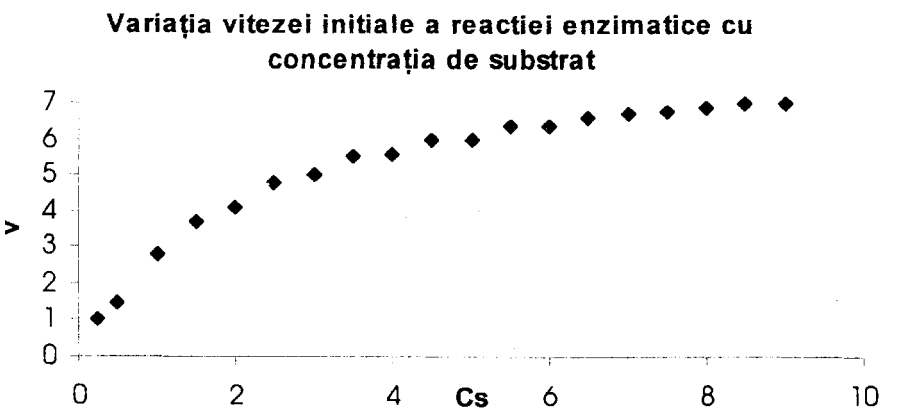
expresia este liniară în v/C_S. Ordonata la origine este v_{max}, panta $-K_M$ și intersecția cu abscisa v_{max} / K_M.

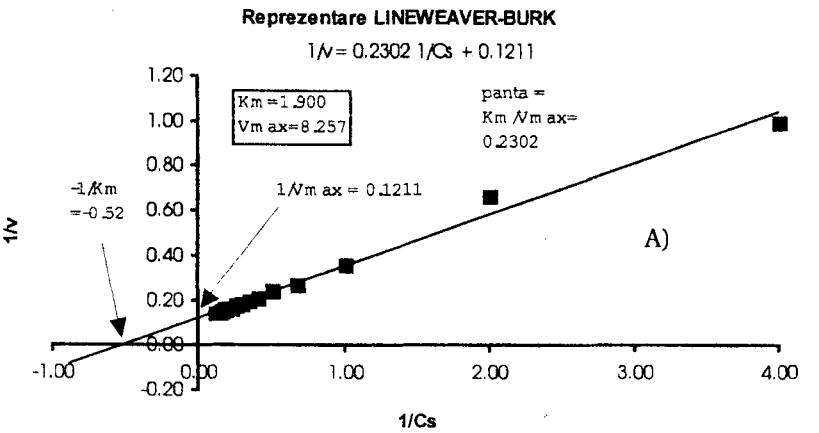
Dintre cele trei forme cel mai mult se utilizează reprezentarea Lineweaver - Burk, chiar dacă prezintă o aglomerare de puncte experimentale în zona concentrațiilor relativ mari de substrat, față de punctele cu concentrație de substrat mică, deci mai afectate de erori experimentale. Celelalte două reprezentări au dezavantajul că aceleași variabile (v in cazul Eadie - Hofstee, respectiv C_S în reprezentarea Langmuir, intră atât în expresia variabilelor independente cât și dependente ale formelor liniare).

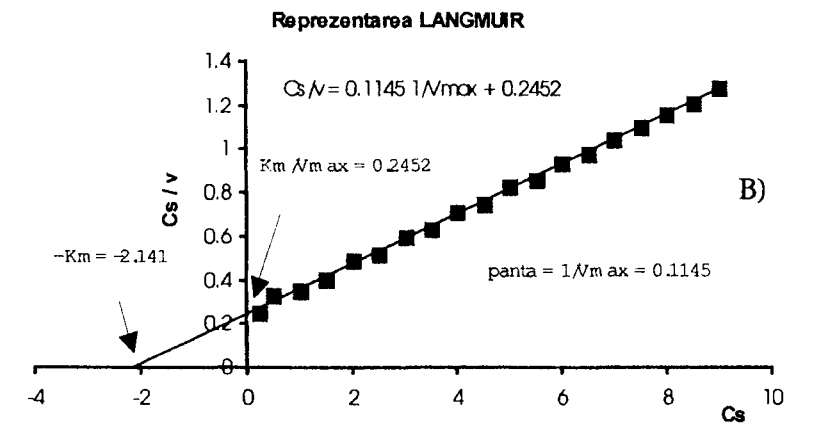
În *Tab. 4.5.* și în *Fig. 4.106. A, B* și *C* se prezintă modul de prelucrare a datelor experimentale (date convenționale) pentru obținerea celor trei tipuri de reprezentări.

Tab. 4.5. *Prelucrare a datelor analitice experimentale pentru determinarea parametrilor ecuației Michaelis-Menten prin diferite variante de liniarizare a ecuației inițiale (date convenționale)*

Date inițiale (convenționale)		Prelucrare Lineweaver-Burk		Prelucrare Langmuir		Prelucrare Eadie - Hofstee	
[S]	v	1/[S]	1/V	[S]	[S]/v	v/[S]	v
0.25	1.0	4.00	1.00	0.25	0.25	4.00	1.0
0.5	1.5	2.00	0.67	0.50	0.33	3.00	1.5
1.0	2.8	1.00	0.36	1.0	0.36	2.80	2.8
1.5	3.7	0.67	0.27	1.5	0.41	2.47	3.7
2.0	4.1	0.50	0.24	2.0	0.49	2.05	4.1
2.5	4.8	0.40	0.21	2.5	0.52	1.92	4.8
3.0	5.0	0.33	0.20	3.0	0.60	1.67	5.0
3.5	5.5	0.29	0.18	3.5	0.64	1.57	5.5
4.0	5.6	0.25	0.18	4.0	0.71	1.40	5.6
4.5	6.0	0.22	0.17	4.5	0.75	1.33	6.0
5.0	6.0	0.20	0.17	5.0	0.83	1.20	6.0
5.5	6.4	0.18	0.16	5.5	0.86	1.16	6.4
6.0	6.4	0.17	0.16	6.0	0.94	1.07	6.4
6.5	6.6	0.15	0.15	6.5	0.98	1.02	6.6
7.0	6.7	0.14	0.15	7.0	1.04	0.96	6.7
7.5	6.8	0.13	0.15	7.5	1.10	0.91	6.8
8.0	6.9	0.13	0.14	8.0	1.16	0.86	6.9
8.5	7.0	0.12	0.14	8.5	1.21	0.82	7.0
9.0	7.0	0.11	0.14	9.0	1.29	0.78	7.0







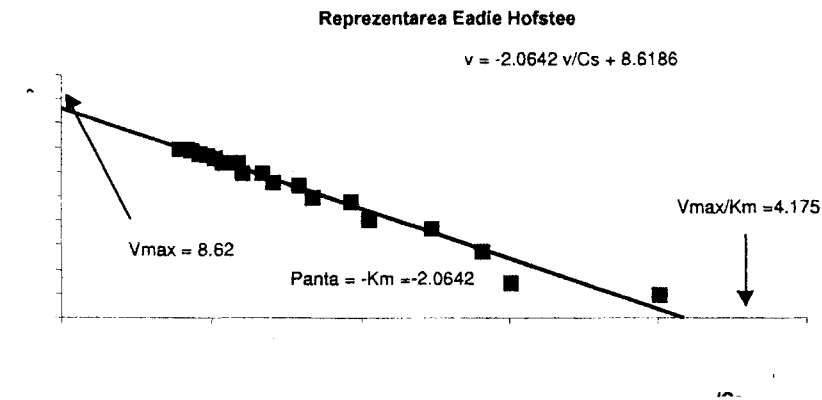


Fig. 4.106. Reprezentări liniarizate derivate din ecuația Michaelis - Menten

Diferențele care apar în determinarea parametrilor modelului michaelian sunt legate de precizia cu care s-a lucrat in procesarea datelor.

4.7.2. Factorii care influențează activitatea enzimatică

4.7.2.1. Influența concentrației de enzimă

Enzima ca substanță catalitică, acționează în concentrații mici comparativ cu substratul. De aceea, ea se manifestă ca factor limitant, adică raportul concentrațiilor enzimei și substratului trebuie să fie extrem de mic. Altfel spus, situsurile catalitice ale enzimei trebuie să fie saturate cu substrat. Aceasta se poate verifica din liniariatea vitezei inițiale a reacției enzimatice cu concentrația de enzimă, (*Fig.4.107. a*) sau din proporționalitatea pantelor dreptelor concentrație produs funcție de timp cu concentrația enzimei (C_E) (*Fig.4.107. b*)

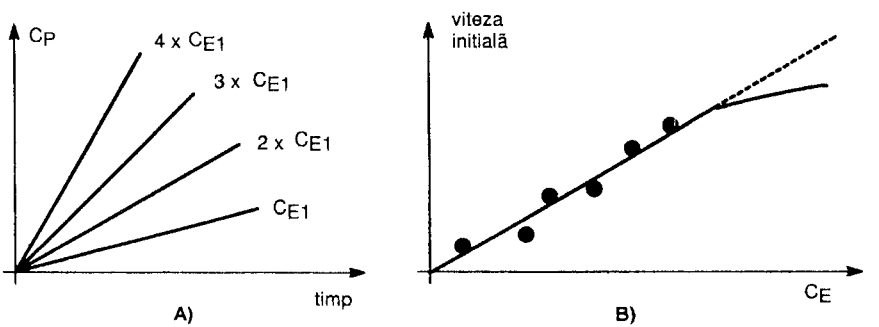


Fig.4.107. Domeniul concentrațiilor uzuale de enzimă la care viteza reacției enzimatice este liniară cu C_E

Creșterea concentrației enzimei poate duce la scăderea creșterii vitezei inițiale, fie datorită epuizării substratului, fie datorită inactivării prin asociere a enzimei. (*Fig.4.107.B*) Nici diluții foarte mari (concentrații foarte scăzute ale enzimei) nu sunt indicate deoarece pot apare:

reduceri ale vitezei inițiale de reacție pentru că:

- pot exista inhibitori în concentrații mici, care consumă o parte din cantitatea inițială de enzimă, efectul catalitic apărând doar după inactivarea inhibitorului.
- enzima are o structură cuaternară care la diluții mari poate disocia, dispărând efectul catalitic
- enzima E este activă doar prin asociere cu un activator A:

$$E + A \rightarrow EA$$

La diluții mari complexul EA poate disocia. Toate aceste comportări generează curbe cinetice viteză inițială – C_E de alura celei prezentate în (*Fig.4.108.A*).

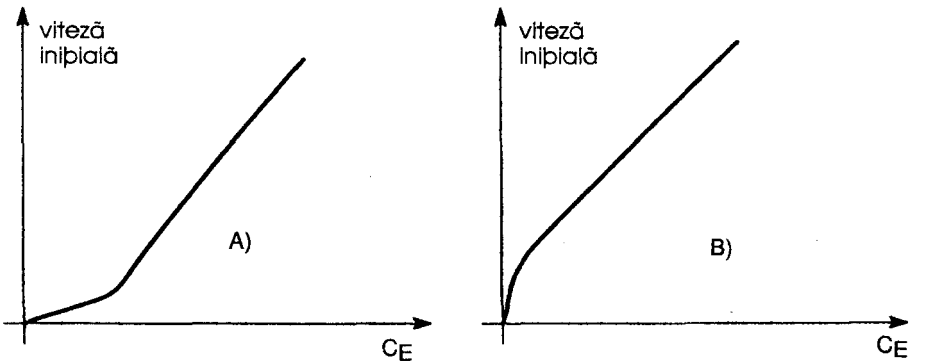


Fig. 4.108. Influența concentrației de enzimă asupra vitezei inițiale de reacție la concentrații mici de enzimă

În alte cazuri, diluțiile foarte mari pot favoriza: *creșteri ale vitezei inițiale de reacție Fig. 4.108.B*) prin:

- disocierea unor complecși particulari enzimă - inhibitor
- disocierea formelor asociate inactive ale enzimelor

4.7.2.2. Influența pH-ului

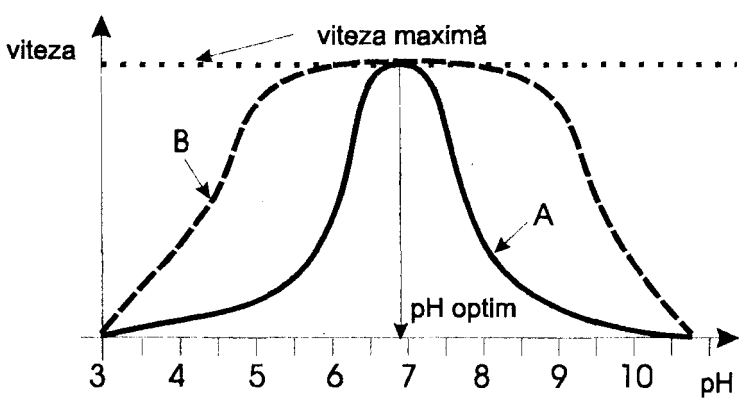


Fig. 4.109. Influența pH-ului asupra activității enzimatice

Natura proteică a enzimelor le face extrem de sensibile la acțiunea factorilor de mediu, implicit a pH-ului. Modificările de pH duc la modificări în numărul și distribuția legăturilor necovalente care intervin în: structura enzimei, în asocierea enzimei cu substratul și în me-

canismul de reacție, toate, cu consecințe asupra actului catalitic. Efectul global este scăderea vitezei reacției enzimatice. Scăderea este cu atât mai pregnantă cu cât abaterea de la pH-ul optim este mai mare.[55]

Valoarea pH-ului este importantă atât pentru determinarea influenței asupra vitezei, dar și pentru evaluarea stabilității enzimei la modificările concentrației ionilor de hidrogen. În consecință, pentru studiul efectului pH-ului se vor realiza două tipuri de experimente. Ambele se vor desfășura în soluții tampon. În primul caz, se vor măsura vitezele reacției enzimatice, la valori diferite ale pH-ului (soluții tampon diferite), dar la aceleași concentrații inițiale de enzimă, substrat și la aceeași temperatură (de regulă optimă) *Fig.4.109.*curba A). În cel de-al doilea tip de experiment, enzima se introduce în soluția tampon, se incubează o anume perioadă la o anumită temperatură (de exemplu 10 min la 30°C), după care se readuce pH-ul la valoarea inițială (de regulă optimă) și se măsoară ca și în cazul precedent viteza reacției enzimatice. *Fig.4.109.*, curba B).

pH-ul optim al enzimelor este variabil: pepsina care lucrează optim la un pH de 2 - 3,3, amilaza salivară la un pH optim de 6,8, în timp ce chimotripsina pancreatică are pH-ul optim situat între 7 și 8.

4.7.2.3. Influența temperaturii

Ecuația lui Arrhenius aplicabilă unei reacții care decurge după un mecanism unic, consacră dependența directă a vitezei de reacție (constantei de viteză) cu temperatura:

$$k = k_0 e^{-\frac{Ea}{RT}} \quad \text{sau prin logaritmare} \quad \ln k = \ln k_0 - \frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad [4.27]$$

Natura proteică, foarte mic entropică, conferă enzimelor o mare sensibilitate termică a structurii. Temperatura își exercită efectul direct asupra structurii globale a enzimelor, asupra topologiei situsului catalitic în particular. De asemenea, temperatura acționează asupra stabilității complexului enzimă - substrat. Pe lângă aceste aspecte legate direct de enzimă, creșterea temperaturii poate deplasa caracterul limitant la un alt proces, cuplat cu reacția enzimatică, difuzia de exemplu. De asemenea, schimbarea temperaturii poate să ducă la modificarea locală a concentrației speciilor reactante (exemplele referitoare la modificarea

[55] Valoarea optimă a pH-ului unei reacții enzimatice este aceea pentru care viteza este maximă. Tot astfel se definește temperatura optimă, tăria ionică optimă etc. În general, o valoare optimă este aceea care extremizează (maximizează, sau după caz minimizează) o variabilă numită **criteriu de optim**

solubilității oxigenului sau dioxidului de carbon sunt edificatoare). În fine, modificarea temperaturii afectează fluiditatea membranelor biologice cu impact asupra transferului de substanță. Complexitatea factorilor care intervin asupra unei reacții enzimatice odată cu modificarea temperaturii, este deci ridicată. Experimental, urmărind evoluția vitezei reacției enzimatice cu creșterea temperaturii, se constată o creștere a intensității proceselor de denaturare structurală, a căror dinamică, după atingerea unei temperaturi optime, va devansa pe aceea a reacției propriuzise. Prin urmare, creșterea de temperatură va duce la creșterea inițială a vitezei de reacție până la atingerea unui maxim al vitezei, la temperatura optimă, după care viteza reacției utile va scădea datorită intensificării proceselor de destabilizare termică a enzimei.

Stabilitatea termică a enzimei poate fi evaluată prin Tm (vezi structura terțiară a proteinelor). Temperatura optimă a enzimelor este situată în jurul temperaturii medii în care enzimele acționează „in vivo". De aceea, temperatura optimă a enzimei este corelată cu sursa din care aceasta s-a obținut[56]

4.7.2.4. Influența forțelor de forfecare

Cu semnificație mai redusă în experimentele in „vivo", forțele de forfecare ce apar la curgerea soluțiilor de enzime, la agitarea acestora, pot duce la scăderea activității, ca urmare a modificării locale structurii enzimatice. Ca și în cazul temperaturii, mărimea efectului depinde de tipul de enzimă precum și de mărimea forțelor de forfecare. În cazul experimentelor realizate cu *catalază, renet* și *carboxipeptidaza A* într-un reoviscozimetru s-a demonstrat o corelație între activitatea remanentă și mărimea adimensională $\gamma\theta$.[57] S-a demonstrat de asemenea că în decursul experimentelor de forfecare absența aerului reduce influența forței de forfecare asupra stabilității edificiului proteic.

4.7.2.5. Eficiența enzimatică

În orice reacție enzimatică la care concentrația substratului depășește pe cea a enzimei se poate considera că enzima parcurge un ciclu:

---

[56] Microorganismele, utilizate ca principale surse de material biologic sunt în funcție de temperatura medie psichrofile sau criofile (20–30°C), mezoflie (30–40°C) și termofile (55–60°C)

[57] In această espresie γ este viteza de forfecare, definită ca raport dintre tensiunea de forfecare τ [Pa] și viscozitatea dinamică m [Pa·s]. ϑ reprezintă timpul de expunere la forfecare [s]

E › ES → E. Raportându-ne la timp, se poate defini o mărime, ***numărul de ciclu*** (k_{cat}), ca ***numărul de molecule de substrat transformate în produs în unitatea de o moleculă de enzimă, atunci când toate moleculele de enzimă din sistem sunt saturate cu substrat.***

Tab.4.6

Enzima	k_{cat}(secundă$^{-1}$)
Catalaza	$4 \cdot 10^7$
Anhidraza carbonică	$1 \cdot 10^6$
Acetil colinestereaza	$1{,}4 \cdot 10^4$
Penicilinaza	$2 \cdot 10^3$
Lactat dehidrogenaza	$1 \cdot 10^3$
Chimotripsina	$1 \cdot 10^2$
ADN polimeraza I	$1{,}5 \cdot 10^1$
Lizozimul	$0{,}5 \cdot 10^0$

În conformitate cu modelul michaelian, k_{cat} se poate măsura prin constanta de viteză a reacției enzimatice care decurge cu viteză maximă:

$$k_3 = \frac{V_{max}}{C_{E_0}} \qquad [4.28.]$$

În aceste condiții, constanta de viteză k_3 este chiar k_{cat}. măsurând de fapt activitatea maximă a unei enzime. Intr-adevăr dacă C_{Eo} se exprimă în moli $\cdot l^{-1}$ dimensiunea lui k_{cat} este de timp^{-1}. Inversul lui k_{cat} ($1 / k_{cat}$) va avea semnificația de timp necesar transformării unei molecule de substrat în produs final.

În *Tab.4.6* sunt prezentate câteva enzime ierarhizate după valorile k_{cat}.

Relevanța mărimii k_{cat}, singură, este redusă deoarece, de regulă, în experimentele 'in vivo", în interiorul celulei, enzimele sunt departe de a fi saturate cu substrat, raportul Cs / K_M fiind situat de cele mai multe ori între 0.01 - 1,0.

Condițiile în care se poate evidenția k_{cat} se ating doar la experimentele „in vitro". În condiții mai apropiate de cele din interiorul celulei, la valori scăzute ale concentrației de substrat Cs, util este raportul k_{cat} / K_M. Importanța acestuia se observă prin prelucrarea ecuației model Michaelis - Menten [4.19]:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot C_{E_0} \cdot C_S}{K_M + C_S} \qquad [4.29]$$

La concentrații reduse ale substratului când $C_S << K_M$, când în numitorul expresiei [4.29] se poate neglija Cs, iar C_{Eo} poate fi considerat egal cu concentrația enzimei libere, C_E se obține:

$$v = \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right) \cdot C_E \; C_S \qquad [4.30]$$

Factorul k_{cat} / K_M are semnificația de constantă aparentă de ordinul II, (desigur aplicabilă în condiții de deficit de substrat). Ca și în cazul saturării enzimei cu substrat constanta de viteză (k_{cat} / K_M) dă măsura eficienței enzimatice. În cazul în care se compară două reacții enzimatice care utilizează substraturi diferite:

$$A + E \rightleftharpoons AE \rightarrow P + E$$
$$B + E \rightleftharpoons BE \rightarrow Q + E$$

În condițiile unor concentrații reduse, mult sub constantele K_M ale proceselor respective, vitezele de reacție pot fi scrise ca:

$$v_A \cong \frac{k^A_{cat} C_E C_A}{K^A_M} \quad \text{cu } C_A << K^A_M \qquad [4.31]$$

$$\text{și} \quad v_B \cong \frac{k^B_{cat} C_E C_B}{K^B_M} \quad \text{cu } C_B << K^B_M \qquad [4.32]$$

Raportul celor două viteze de reacție, catalizate de aceeași enzimă, va exprima capacitatea relativă enzimei de a transforma substratele A și B în produșii P, respectiv Q. Admițând că valoarea concentrației de enzimă este aceeași în ambele reacții, rezultă că:

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{\left(k^A_{cat} / K^A_M\right)}{\left(k^A_{cat} / K^A_M\right)} \cdot \frac{C_A}{C_B}. \qquad [4.33]$$

De aici semnificația de *eficiență catalitică* a raportului k_{cat}/K_M este evidentă.

4.7.2.6. Enzime multisubstrat și/sau multipodus

Uneori, reacțiile catalizate de enzime, transformă două sau mai multe substraturi în unul sau mai mulți produși. Reacțiile oxidoreductazelor, ale transferazelor, hidrolazelor, ligazelor sunt exemple tipice. Drept substrat poate fi considerat și cofactorul enzimatic, în ideea că la sfârșitul reacției chimice catalizate, forma chimică a acestuia se modifică ($NAD^+ \rightarrow NADH,H^+$, $FAD \rightarrow FADH_2$ etc.).

În funcție de numărul de substraturi, respectiv produși, se folosesc, după W.W. CLELAND prefixele Uni-, Bi-, Ter-, Quad- etc. Astfel o reacție de tip: A › B (izomerizare de exemplu) este denumită **Uni - Uni,** în timp ce o reacție de tip: A › B + C (scindare) este denumită **Uni - Bi,** ori reacția de dublu schimb: A + B › C + D se poate denumi reacție **Bi-Bi.**

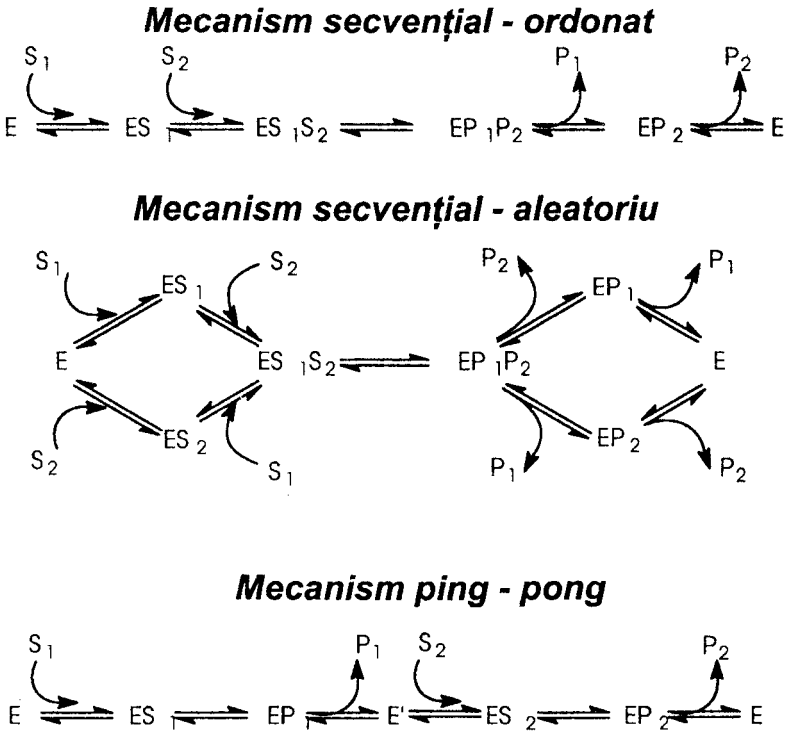


Fig. 4.110. Principalele tipuri de mecanisme ale reacțiilor bisubstrat

Reacțiile multisubstrat și multiprodus, care presupun eliberarea produșilor de reacție numai după ce au fost legate toate substraturile, poartă numele de **reacții secvențiale**, spre deosebire de cele în care, după legarea unui substrat, are loc eliberarea unui produs, apoi are loc legarea altui tip de substrat și eliberarea celui de-al doilea tip de produs, ș.a.m.d., denumite **reacții ping-pong.**

Reacțiile **secvențiale** pot fi **ordonate**, dacă legarea substraturilor respectiv eliberarea produșilor se face într-o secvență determinată, spre deosebire de reacțiile **secvențial aleatorii,** la care atașarea substraturilor, respectiv eliberarea produșilor are loc într-o ordine întâmplătoare. Schematic mecanismele de reacție secvențial (cu cele două variante) și ping pong sunt prezentate în *Fig. 4.110.*

4.7.2.7. Inhibiția enzimatică

Substanțele care interacționând cu enzima duc la scăderea activității acesteia poartă numele de inhibitori. Ei diferă prin origine (endogeni sau xenobiotice) precum și prin mecanismul de interacțiune cu proteina enzimatică (în competiție cu substratul sau fără competiție cu acesta).

4.7.2.7.1. Inhibiția competitivă

Inhibitorul concură cu substratul la legarea pe enzimă. Dacă reacția cu substratul este descrisă de modelul:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

reacția competitivă cu inhibitorul are o formă asemănătoare:

$$E + I \underset{k_5}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} EI \not\rightarrow \text{fără transforma}$$

Similar cu modul de definire al constantei de disociere enzimă - substrat **Ks** [4.11] se definește și constanta inhibitorului **Ki** (tot o constantă de disociere, de data aceasta a inhibitorului de pe enzimă):

$$Ki = \frac{C_I \cdot C_E}{C_{EI}} = \frac{k_5}{k_4} \qquad [4.34]$$

Cu cât valoarea lui Ki va fi mai mare cu atât complexul enzimă - inhibitor va fi mai puțin stabil.

Pentru evaluarea vitezei globale a reacției enzimatice, pe baza bilanțului enzimei și a faptului că ecuația de formare a produsului este limitantă de viteză se poate scrie că:

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} + C_{EI} \qquad [4.35]$$

$$v = k_3 C_{ES} \qquad [4.36]$$

Se poate construi expresia:

$$\frac{v}{C_{E_0}} = \frac{k_3 \cdot C_{ES}}{C_E + C_{ES} + C_{EI}} \qquad [4.37]$$

Eliminând C_{ES} și C_{EI} prin intermediul relațiilor de definiție K_S și K_I se obține:

$$\frac{v}{C_{E_0}} = \frac{k_3 \cdot C_S}{K_S + C_S + C_I \cdot \frac{K_S}{K_I}} \qquad [4.38]$$

sau ținând cont că $K_S \approx K_M$ și că $k_3 \cdot C_{E0} = Vmax$

$$v = \frac{V_{max} \cdot C_S}{K_M\left(1 + C_I \cdot \frac{1}{K_I}\right) + C_S} \qquad [4.39]$$

prin inversare se obține:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left[\frac{K_M}{C_S}\left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right) + 1\right] \qquad [4.40]$$

Notând K_M' mărimea $K_M \cdot \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right)$, denumind-o **constantă K_M aparentă** și înlocuind-o în expresiile [4.16] și [4.19] vom obține formal, expresiile ecuațiilor MICHAELIS–MENTEN [4.19] respectiv LINEWEAVER–BURK [4.24]:

$$v = \frac{V_{max} \cdot C_S}{K_M' + C_S} \qquad [4.41]$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left[\frac{K'_M}{C_S} + 1\right] \qquad [4.42]$$

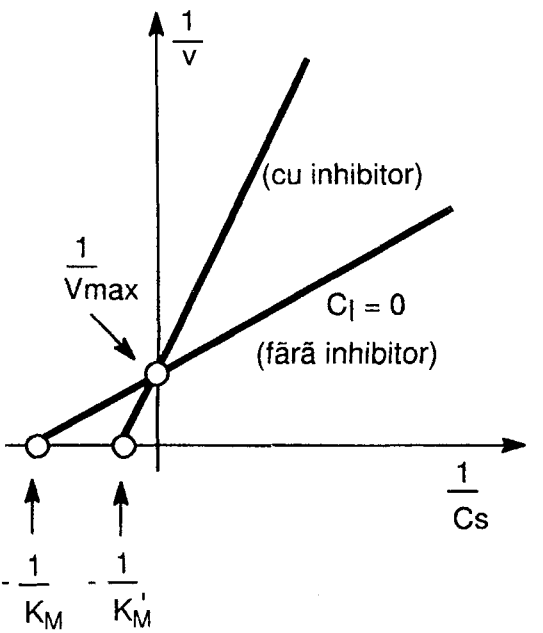


Fig. 4.111. Drepte Lineweaver-Burk in cazul inhibiției competitive

deoarece constanta aparentă are valoare mai mare decât constanta clasică, prin prezența inhibitorului competitiv, enzima își micșorează aparent afinitatea pentru substrat, valoarea vitezei maxime nefiind afectată. Prin reprezentarea LINEWEAVER - BURK se poate identifica acest tip de inhibiție, relevând cineticile enzimatice în prezența și în absența inhibitorilor.

Inhibitori competitivi. Substanțele care se comportă ca inhibitori competitivi posedă analogie structurală cu substratul. Această analogie, permite inhibitorului să stabilească interacțiuni similare atât ca număr, tip dar și ca distribuție spațială (topologie)/*Fig.4.114.*-. Problema care apare, este deci una de specificitate enzimatică.

Un exemplu este oferit de *β-galactozidaza*[58] din *E. Coli*, o enzimă care hidrolizează lactoza la glucoză și galactoză. Enzima, un tetramer cu patru subunități identice (masa totală 520 kD) se poate doza cu un substrat artificial (sintetic) analog 2-nitrofenil β-D galactopiranozida, (**ONFG**) asupra căruia enzima acționează producând hidroliza la galactoză și 2-nitrofenil (K_M = 0,95 mM la 20°C și pH = 7,6)[59]. În procesul de dozare, dacă se introduce 2-tiopropil-β-D-galactozida acesta acționează ca inhibitor competitiv tipic deoarece participă doar la faza de legare pe situsul catalitic. Galactozidaza nu este capabilă să scindeze hidrolitic legătura tioglicozidică.

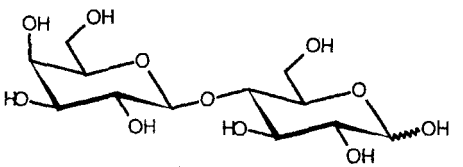
Din acest exemplu se observă că enzima posedă specificitate doar față de componenta glucidică, orice modificare la nivelul acesteia inactivând-o. Componentele atașate de galactoză influențează în mică măsură legarea pe situsul catalitic. În locul 2-nitrofenil-β-D-galactopiranozidei se mai poate utiliza și **X-Gal**, numele de cod al 5-bromo–4-cloro–3-indolil β-D-galactopiranozidei.

Analogii stărilor de tranziție sunt de asemenea inhibitori competitivi, deoarece ei se leagă mai întâi de situsul catalitic al enzimei, realizând complexul enzimă-analog care ulterior trece în complexul stabilizat enzimă-stare de tranziție (vezi paragraful legat de mecanismul acțiunii enzimatice și abzime).

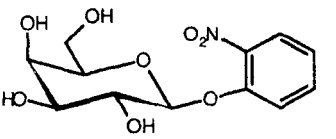
---

[58] Această enzimă va exemplifica reglarea la nivel transcripțional a exprimării genetice.

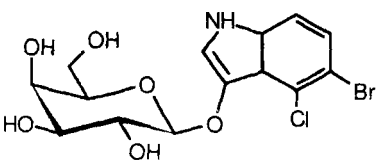
[59] Dozarea se bazează pe diferența între maximele de absorbție ale nitrofenolului liber în mediu acid (absorbție în UV apropiat) și ale 2-nitrofenolatului în mediu alcalin (420 nm, când este galben). Se măsoară deci intensitatea absorbției după acțiunea enzimei și alcalinizare.



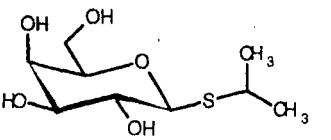
Lactoza



2-nitrofenil- β-D-galactpiranozida



5-bromo-4-cloro-3 -indolil- β-D-galactpiranozida



2-tiopropil- β-D-galactozida

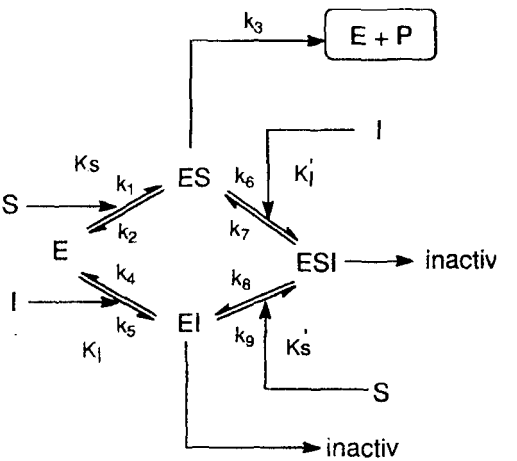


Fig.4.112. Inhibiția necompetitivă (schema de principiu)

4.7.2.7.2. Inhibiția necompetitivă și anticompetitivă

În cazul în care inhibitorul se leagă de enzimă într-un situs diferit de cel catalitic, și prin aceasta se reduce viteza reacției enzimatice, vorbim de *inhibiție necompetitivă.*

Lipsa de competiție între substrat și inhibitor face posibilă formarea unui complex enzimă - substrat - inhibitor, ordinea legării celor două substanțe putând fi oarecare, conform *Fig. 4.112.*

Pentru formalizare, plecăm de la ipoteza că afinitățile enzimei față de substrat și față de inhibitor sunt diferite. De asemenea considerăm că ne aflăm în condițiile stării staționare.

Utilizând același model de calcul ca și în cazul inhibiției competitive avem:

$$v = k_3 C_{ES} \quad [4.43]$$

$$C_{eo} = C_E + C_{ES} + C_{EI} + C_{EIS} \quad [4.44]$$

***Raportul v/C_{Eo}* este:**

$$\frac{v}{C_{E_0}} = \frac{k_3 \cdot C_{ES}}{C_E + C_{ES} + C_{EI} + C_{EIS}} \quad [4.45]$$

Concentrațiile complexelor ES, EI și EIS se deduc din expresiile constantelor de disociere K_S, K_I și K_I' (sau K_S').

Prin înlocuire în relația [12] se obține:

$$\frac{v}{C_{E_0}} = \frac{k_3 \cdot \frac{C_E \cdot C_S}{K_S}}{C_E + \frac{C_E \cdot C_S}{K_S} + \frac{C_E \cdot C_I}{K_I} + \frac{C_E \cdot C_S \cdot C_I}{K_S \cdot K'_I}} \quad [4.46]$$

prin împărțire cu C_E / K_S se obține:

$$\frac{v}{C_{E_0}} = \frac{k_3 \cdot C_S}{K_S \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right) + C_S \left(1 + \frac{C_I}{K'_I}\right)} \quad [4.47]$$

Ținând seama de definiția vitezei maxime obținem:

$$v = \frac{V_{max} C_S}{K_S \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right) + C_S \left(1 + \frac{C_I}{K©_I}\right)} \quad [4.48]$$

prin inversare se obține:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left[\left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right) \cdot \frac{K_S}{C_S} + \left(1 + \frac{C_I}{K©_I}\right) \right] \quad [4.49]$$

dacă $K_I = K'_I$, suntem în cazul *inhibiției necompetitive pure*, iar ecuațiile [4.48] și [4.49] pot fi scrise sub forma [4.50], respectiv [4.51]:

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right)} C_S}{K_S + C_S} \quad [4.50]$$

respectiv:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{C_I}{K_I}}{V_{max}} \left[\frac{K_S}{C_S} + 1 \right] \quad [4.51]$$

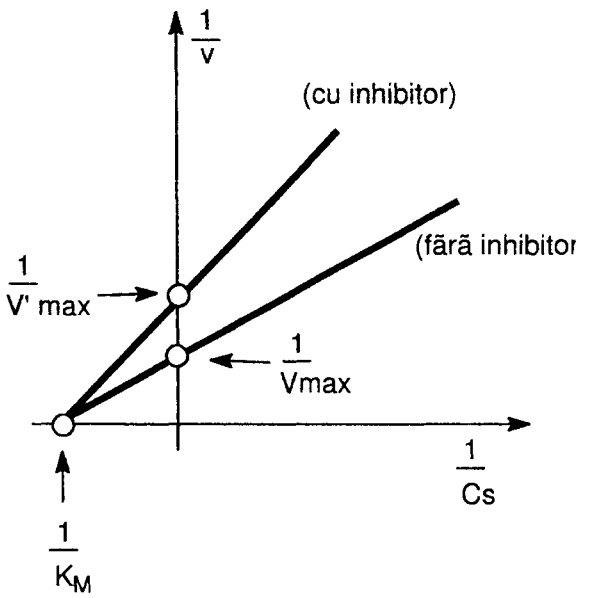


Fig. 4.113. Drepte Lineweaver-Burk în cazul inhibiției necompetitive

Dacă facem apel și la aproximația $Ks \approx K_M$, ecuațiile [4.50] și [4.51] vor avea formal același aspect cu reprezentările MICHAELIS respectiv LINEWEAVER - BURK tipice.

Factorul suplimentar care apare în modelul inhibiției necompetitive față de modelul fără inhibiție, este întotdeauna supraunitar și pozitiv[60]. De aceea viteza maximă aparentă va fi mai mică decât în cazul michaelian clasic (*Fig.4.113*).

În reprezentarea LINEWEAVER - BURK, a reacției inhibate necompetitiv, se observă că viteza maximă scade (inversul acesteia crește).

Ecuațiile [4.48] și [4.49] permit analiza comparativă a comportării sistemului de reacție în funcție de raportul K_I / K'_I. Așa după cum rezultă din fig. K_I cuantifică inversul afinității enzimei față de inhibitor, iar K'_I cuantifică inversul afinității complexului enzimă substrat față de inhibitor. Sunt posibile următoarele situații extreme:

1. **K'_I tinde către infinit.** În acest caz inhibitorul nu se atașează de complexul ES format. Suntem în cazul ***inhibiției competitive.***

[60] Factorul este unitar atunci când $K_I \rightarrow \infty$, adică atunci când enzima are afinitate nulă față de inhibitor

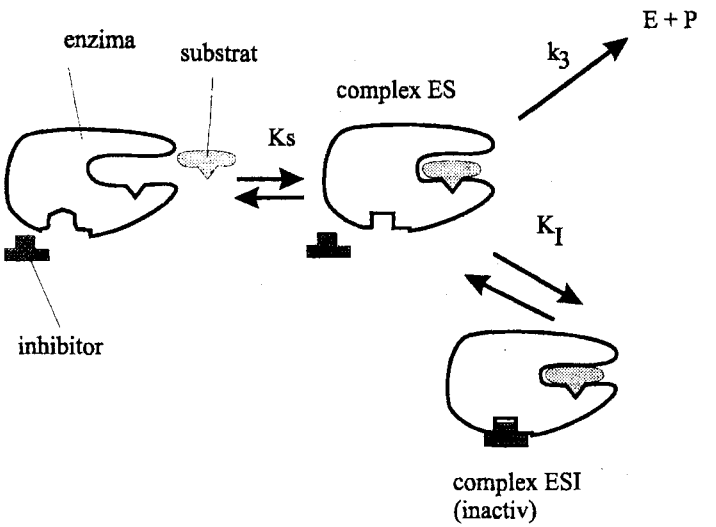


Fig.4.114. Schema de principiu a inhibiției competitive

2. **K_I și K'_I au valoare egală.** Suntem în cazul ***inhibiției necompetitive***
3. **K_I tinde către infinit.** Acestă situație este cunoscută ca inhibiție anti-competitivă. Mecanismul de inhibiție presupune legarea inițială a substratului (enzima pură nu are nici o afinitate față de inhibitor (K_I tinde către infinit). După ce s-a format complexul enzimă - substrat inhibitorul se atașează de enzimă, împiedicând actul catalitic. Acest caz este cunoscut ca ***inhibiție anti-competitivă***. În ecuația [4.49], ca reprezentare LINEWEAVER-BURK, termenul $C_I / K_I \rightarrow 0$, iar factorul $1 + \frac{C_I}{K'_I}$ va afecta panta dreptei ecuației [4.49] termenul liber, având aceeași valoare ca și în modelul fără inhibiție (ecuația [4.24]. Reprezentarea grafică a modelului neinhibat și a inhibiției anticompetitive relevă paralelismul dreptelor LINEWEAVER-BURK (*Fig.4.115.*).

De cele mai multe ori în practică se întâlnesc modele intermediare între A, B și C caracterizate prin valori finite ale constantelor K_I și K'_I.

Gradul de apropiere cu unul sau cu altul dintre modele se poate relava din reprezentările Lineweaver - Burk.

Inhibiția prin produs și prin substrat

Așa după cum s-a enunțat, orice substanță capabilă să interacționeze cu o enzimă, reducându-i viteza de reacție este un inhibitor.

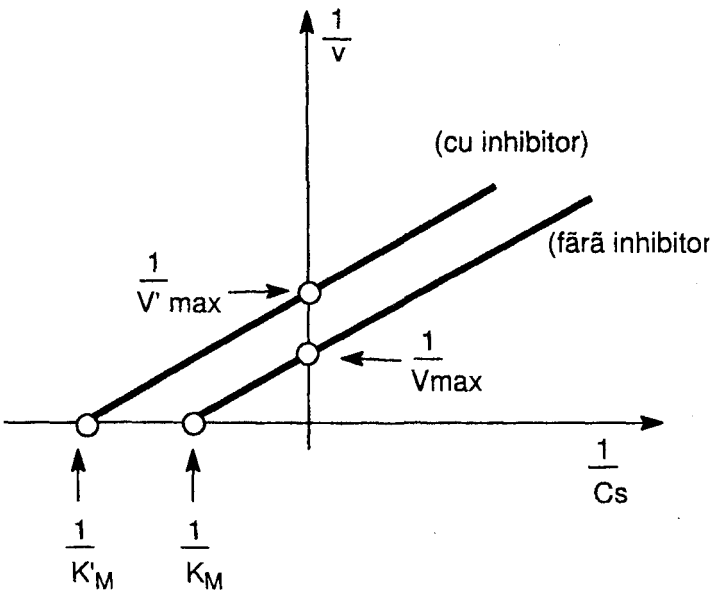


Fig.4.115. Schema de principiu a inhibiției anticompetitive

4.7.2.7.3. Inhibiția prin produs

Cinetica michaeliană este studiată prin măsurarea vitezei inițiale. Această modalitate exclude produsul de la o eventuală interacțiune cu enzima. Dar, produsul poate avea această abilitate. Un astfel de sistem poate fi studiat prin introducerea în mediul de reacție a unei anume cantități de produs. Viteza globală a reacției enzimatice (de formare a produsului) este egală cu diferența reacției directe (de formare a produsului cu $v_{max\ S}$ și K_{MS}) și a reacției inverse (de consum a produsului cu $v_{max\ P}$ și K_{MP}):

$$v = \frac{V_{maxP} \cdot C_S}{K_{MS}\left(1 + \frac{C_P}{K_{MP}}\right) + C_S} - \frac{V_{maxS} \cdot C_P}{K_{MP}\left(1 + \frac{C_S}{K_{MS}}\right) + C_P} \qquad [4.52]$$

dacă reacția inversă poate fi neglijabilă, $v_{max\ S} \rightarrow 0$, atunci rămâne doar primul termen care are forma clasică a inhibiției competitive.

4.7.2.7.4. Inhibiția prin substrat

De multe ori, la utilizarea concentrațiilor ridicate de substrat se constată o scădere a vitezei de reacție detectabilă vizibil pe o reprezentare de tip LINEWEAVER - BURK (*Fig. 4.116*)

Această scădere poate avea mai multe explicații. Două dintre ele, cele mai plauzibile sunt următoarele:

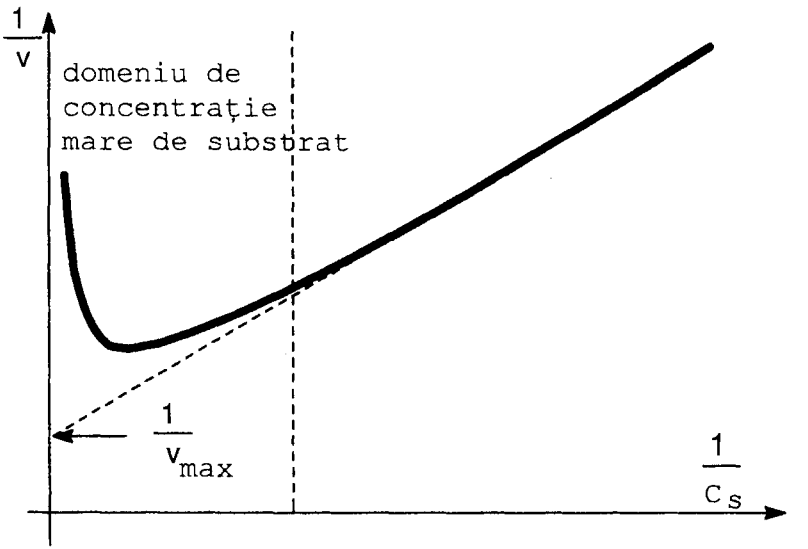


Fig. 4.116. Comportamentul enzimatic în domeniile de concentrație ridicată de substrat

1. odată cu concentrația de substrat, crește concentrația impurităților pe care acesta le conține.
2. la concentrații mari, substratul este forțat să se plaseze stabil în poziții neproductive, împiedicând accesul altor molecule de substrat la situsul activ.

4.7.2.7.5. Inhibiția reversibilă / ireversibilă

Inhibiția, ca proces poate fi reversibilă sau ireversibilă. Inhibiția reversibilă presupune atașarea inhibitorului prin interacțiuni necovalente, care pot fi desfăcute. Inhibitorul poate fi îndepărtat, de regulă prin procese difuzive, dializa fiind cel mai comun. Cu cât concentrația de inhibitor este mai scăzută, indiferent de mecanismul prin care acesta acționează, efectul asupra vitezei de reacție este mai mic (ecuațiile 4.39; 4.50 și 4.52).

Spre deosebire de inhibiția reversibilă, cea ireversibilă presupune o atașare covalentă, puternică a inhibitorului. Acesta nu mai poate fi desprins de pe enzimă sau complexul enzimă substrat, de aceea efectul introdus are caracter permanent.

4.7.3. Reglarea activității enzimatice

Funcționarea celulei, țesutului sau a organismului presupune un complex de activități metabolice prin care se produc și se degradează substanțe, în raporturi cantitative și de succesiune foarte bine reglate. În acest context, rolul biocatalitic exercitat de enzime este crucial și exercitarea acestuia este supusă unui proces de reglare pe cât de complex, pe atât de eficient.

Reglarea activității enzimatice se face la două nivele:

*1. **reglarea concentrației locale a enzimelor***, realizată prin:

- mecanisme care intervin în exprimarea genelor corespunzătoare (la nivel transcripțional sau la nivel translațional),
- mecanisme de degradare ale enzimelor
- mecanisme de transport al enzimelor de la locul sintezei până la locul exercitării acțiunii. Mecanismele concrete ale acestui tip de reglare vor fi detaliate la capitolul reglarea exprimării genetice respectiv la sinteza proteinelor.

*2. **reglarea efectivă a funcționării (activității) enzimei.***

Enzima existentă va cataliza transformarea substratului în produs. Viteza procesului este dependentă de o serie de factori, asupra cărora organismul acționează. Concentrația speciilor reactante reprezintă modalitatea „banală" a reglării activității enzimatice. Reacția se va deplasa în sensul dictat de abaterea concentrațiilor efective de la valorile de echilibru. O altă modalitate de reglare, caracteristică enzimelor cu afinitate mică pentru substrat este legată de concentrația substratului. Atunci când concentrația substratului se situează mult sub valoarea lui K_M (vezi ecuația Michaelis - Menten), viteza de reacție este liniar dependentă de concentrația de substrat. În cazurile în care concentrația substratului depășește valoarea lui K_M, efectul modificării concentrației se exercită doar asupra echilibrului (reacția fiind de ordinul zero. pH-ul constituie un mijloc auxiliar de reglare, avându-se în vedere că fiecare enzimă își are propria plajă ori chiar valoare optimă a pH-ului. În celulă există însă mecanisme care asigură homeostazia pH-ului, care limitează drastic intervenția pH-ului ca mijloc de reglare. Pentru a realiza funcția reglatorie, celula dispune de alternative mai sofisticate care se aplică unui număr redus de enzime din mulțimea celor existente la un moment dat. Aceste enzime reglabile posedă particularități structurale, care le conferă o complexitate sporită față de celelalte enzime. Mecanismele efective prin care are loc reglarea sau modularea activității enzimatice sunt în principal de două tipuri: 1) ***modificări covalente***

realizate prin atașarea unor fragmente sau clivarea unor legături și 2) ***modificări necovalente***, realizate prin intervenția unor substanțe străine (efectori) care se pot atașa fie la situsul catalitic (inhibitori competitivi), fie la un situs distinct numit situs alosteric. Prin aceste modificări se modifică fie afinitatea enzimei pentru substratul propriu (Km), fie viteza maximă a procesului v_{max}.

4.7.3.1. Reglarea activității enzimelor prin modificări covalente

Modificările covalente comută de regulă enzima dintr-o stare inactivă într-o stare activă. Aceste modificări constau în formarea sau desfacerea unor legături covalente. Procesul poate fi ireversibil sau reversibil. Modificările covalente ireversibile sunt caracteristice enzimelor care sunt produse in formă inactivă. Aceste forme inactive reprezintă o rezervă imediat disponibilă de enzimă și uneori structuri rezistente la agresivitatea mediului în care sunt sintetizate. Odată ajunse la locul acțiunii, sunt activate prin desfacerea unor legături covalente. O altă categorie de enzime activabile prin clivaj proteolitic ireversibil, sunt cele care trebuie să participe la acțiuni rapide al căror moment de producere este aleatoriu. Este cazul enzimelor care participă la cascada de reacții caracteristică procesului de coagulare sangvină. În cazul apariției hemoragiilor, intervenția trebuie să fie rapidă, neexistând timpul necesar sintezei echipamentului enzimatic necesar. Acesta există sub formă latentă, inactivă, care, printr-o modificare covalentă, hidrolitică se va activa diminuând astfel timpul de răspuns.

4.7.3.1.1. Hidroliza parțială, ireversibilă a enzimelor ca modalitate de reglare

Multe dintre enzime sunt sintetizate și secretate sub formă inactivă numită **proenzimă** sau **zimogen**. Prin excizia (cu ajutorul unei enzime proteolitice) a unei porțiuni din catena peptidică a proenzimei rezultă enzima activă. Exemple de enzime astfel reglabile (activabile) le întâlnim printre enzimele digestive precum: chimotripsina, tripsina, pepsina, carboxipeptidazele A și B, fosfolipazele, printre enzimele (factorii) implicate în coagularea sângelui (vezi vitamina K) ori printre enzimele implicate în dezvoltarea programată (colagenaza, chitinsintetaza etc.).

Prin excizia unui fragment N-terminal din zimogen, se modifică întreaga structură spațială (întreaga topologie) a situsului catalitic, acesta din urmă devenind apt pentru procesul catalitic.

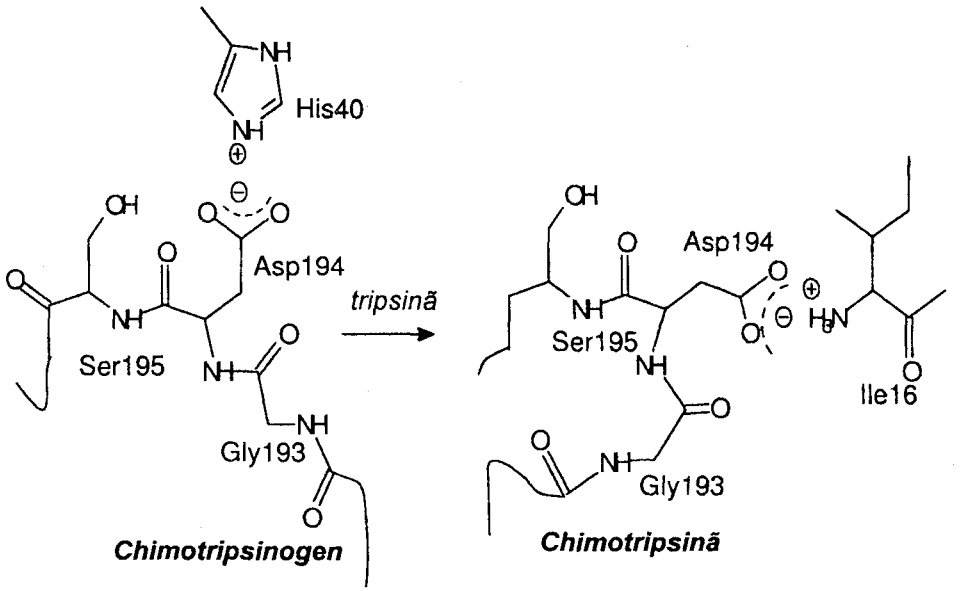


Fig.4.117. Modificarea conformaţională consecutivă clivajului proteolitic care duce la formarea situsului catalitic la chimotripsină

Exemplificând pe transformarea chimotripsinogen → chimotripsină realizată sub influenţa tripsinei, în molecula de chimotripsinogen, se remarcă existenţa triadei catalitice (vezi serinproteazele) Asp 102, His 57 şi Ser 195. Această triadă este încă nefuncţională datorită faptului că topologia definită iniţial este improprie interacţiunii cu substratul. Prin clivare proteolitică cei trei componenţi ajung într-o topologie aptă de actul catalitic. Modificarea conformaţională care activează chimotripsinogenul este schimbarea restului His40 ca partener stabilizant al Asp194 cu gruparea amoniu din Ile16 a fragmentului clivat. (*Fig. 4.117*). De asemenea prin clivajul proteolitic, se modifică poziţia Gly 194, care iniţial împiedică atât fixarea substratului, cât şi acţiunea catalitică asupra acestuia. Un proces similar apare şi la activarea tripsinogenului.

Formarea zimazei (enzimei active) prin excizia unui fragment din zimogen este un proces ireversibil. Odată activată enzima, activitatea sa nu va scădea decât prin digestie, inhibiţie sau prin diluţie. Astfel de mecanisme de activare se întâlnesc şi în cazul hormonilor peptidici precum insulina ori angiotensina, care sunt secretaţi iniţial sub formă inactivă de prohormoni. Ei vor fi activaţi prin excizie proteolitică.

4.7.3.1.2. Reglarea activității enzimelor prin modificări covalente reversibile

I. Reglarea enzimelor prin fosforilare-defosforilare

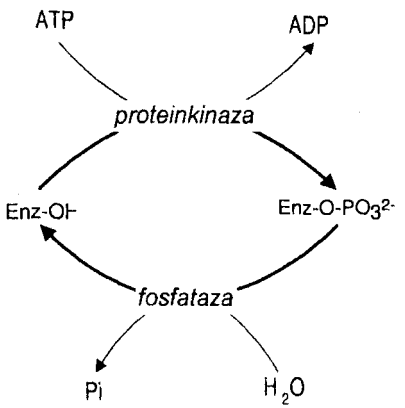


Fig. 4.118. Fosforilarea-defosforilarea enzimatică

Prin introducerea unui rest fosfat în molecula unei proteine, apar două sarcini negative care prin interacțiune cu resturile de aminoacizi vor produce o modificare conformațională care se transmite situsului catalitic. Spre deosebire de clivarea proteolitică, reglarea prin fosforilare este reversibilă. Fosforilarea (transferul de rest fosfat pe o grupare OH aparținând unui rest serinic, treoninic sau tirozinic) este realizată de către o **proteinkinază**, donorul fiind de regulă ATP-ul. (*Fig.4.118.*). Reacția inversă catalizată de o **fosfatază** hidrolizează legătura fosfoesterică punând în libertate fosfatul anorganic.

Comutarea enzimei de la forma fosforilată la cea defosforilată și invers, se face sub influența unor semnale extracelulare precum hormonii sau factorii de creștere. Adrenalina, de exemplu activează prin intermediul cAMP (acidul adenilic ciclic, vezi nucleotide) o proteinkinază care fosforilează o fosforilazkinază (o nouă proteinkinază), aceasta la rândul său fosforilând fosforilaza, enzima care eliberează glucoza din glicogen. Prin fosforilare sunt reglate o serie de enzime întâlnite în **metabolismul glucidic**: glicogenfosforilaza, fosforilazkinaza, glicogensintaza, fosfofructokinaza–2, piruvatkinaza și piruvat dehidrogenaza (vezi glicoliza respectiv gluconeogeneza) (vezi Vol II), în **metabolismul lipidic**: hidroximetilglutaril-CoA reductaza, acetil-CoA carboxilaza și triacilglicerol lipaza, în **metabolismul aminoacizilor**: cetoacid ramificat dehidrogenaza, fenilalanil hidroxilaza, tirozin hidroxilaza etc.

II. Reglarea activității enzimatice prin adenililarea – deadenililare

Prin atașarea fosfoesterică a restului adenilil (voluminos, încărcat negativ) de un rest de tirozină aflat în vecinătatea situsului catalitic, se blochează funcția catalitică ce poate fi exercitată de glutaminsintetaza, o enzimă cheie din metabolismul amoniacului din *Escherichia coli.* Rolul acestei enzime este de a atașa pe un rest de glutamat amoniacul existent în mediu. Procesul de adenilare este realizat de o adenililtransferază, la depășirea unui prag critic al raportului concentrațiilor glutamină – glutamat, respectiv carbamilfosfat, glucozamino–6-fosfat, triptofan, alanină, glicocol, histidină, citidintrifosfat, respectiv AMP (vezi Cap. 5 nucleotidele). Toți acești compuși reprezintă pentru enzimă indicatori că rezervele de amoniac sunt suficiente, ca urmare nu mai este necesară acumularea acestui produs. La rândul său, adenililtransferaza este activată prin deuridinilare, adică prin detașarea unui rest de acid uridilic, proces declanșat de concentrații crescute ale glutaminei. Procesul invers, de dezactivare este declanșat de concentrații scăzute ale aceluiași metabolit.

III. Formarea și desfacerea punților disulfurice

Este o altă modalitate prin care se poate modifica structura enzimei, și în consecință se poate interveni asupra mecanismului său de acțiune. Această modalitate este utilizată de plante fiind întâlnită la unele enzime care degradează glucidele. Reducerea punților disulfurice se face pe seama oxidării unor grupări tiolice din structura unei proteine de masă mică, *tioredoxina.* La rândul său tioredoxina este redusă de reacții redox dependente de lumină, reacții care comută metabolismul glucidic de la oxidare (catabolism) la reducere (anabolism).

4.7.3.2. Reglarea activității enzimelor prin modificări necovalente; Alosteria

O modalitate mai subtilă de reglare a activității enzimatice este alosterismul. Termenul de alosterie (allos = altul, diferit; steros = spațiu, loc) desemnează, modificări care apar în conformația și legat de aceasta, în activitatea unei enzime, datorită legării unui compus într-un loc distinct de situsul catalitic. Enzimele care posedă această proprietate dispun de o modalitate suplimentară de reglare a reacției catalizate. Compusul care se leagă de situsul alosteric poartă numele de **efector** sau **modulator** și în funcție de acțiunea concretă asupra vitezei de reacție sau afinității enzimei față de substrat, modulatorul poate fi activator sau inhibitor.

Studiile efectuate asupra unui număr mare de enzime alosterice a relevat că acestea posedă o serie de caracteristici definitorii:

- ♦ structură cuaternară.
- ♦ au comportare nemichaeliană, curbele cinetice v/[S], având o alură sigmoidală. Dacă la o enzimă michaeliană, cei doi parametri K_M şi v_{max} sunt constanţi, la enzimele alosterice, aceşti parametri pot fi variabili. După parametrul care suferă modificări, distingem enzime de tip K la care se modifică numai afinitatea faţă de substratul activ, şi enzime de tip V, la care se modifică doar viteza de reacţie.
- ♦ modificările conformaţionale induse de efectorul alosteric sunt temporare şi doar de ordin cantitativ.
- ♦ au funcţie de reglare în metabolism, fiind prezente pe căile biosintetice principale.

Interacţiunea dintre situsul catalitic şi situsul alosteric şi de asemenea între situsurile catalitice ale aceleiaşi enzime, este denumită prin analogie cu comportamentul hemoglobinei, dar prin extensie, (deoarece în cazul enzimelor efectorul este diferit de substrat), efect de cooperativitate, sau de cooperare.

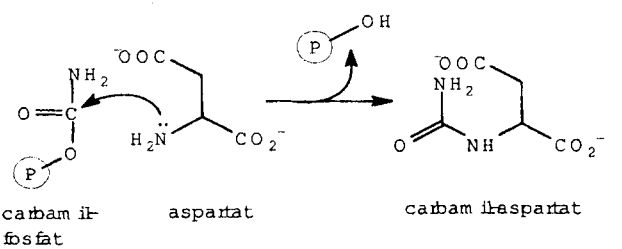


Fig. 4.119. Reacţia catalizată de aspartat transcarbamilază

Un exemplu clasic, bine studiat de enzimă alosterică este aspartat transcabamilaza din *Escherichia coli* (E.C. 2.1.3.2) *Fig. 4.119.* Aceasta se găseşte în ciclul ureogenetic (vezi în volumul II) şi catalizează prima reacţie dintr-un lanţ care conduce la biosinteza nucleotidelor pirimidinice:

Dacă se variază concentraţia de aspartat în mediu, menţinând constanţi ceilalţi parametri, curba cinetică va avea un aspect sigmoidal. Curba din *Fig. 4.120.*, redă comportarea enzimei în absenţa efectorilor.

Studiile s-au făcut în prezenţa unor substanţe diferite. CTP-ul este un inhibitor tipic. În schimb AMP sau ATP sunt activatori. Tratându-se enzima cu 4-cloromercuribenzoat, un reactiv al grupărilor tiolice, se constată că enzima devine michaeliană, pierzându-şi sensibilitatea la

activatorii susmenţionaţi, dovadă că situsul alosteric posedă în acest caz un rest de cisteină, în timp ce situsul catalitic nu. Enzima cu situsul alosteric blocat se numeşte enzimă desensibilizată.

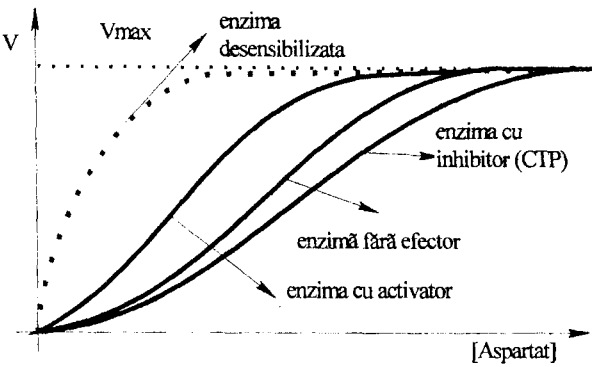


Fig.4.120. Comportamentul aspartat transcarbamilazei în prezenţa şi absenţa efectorilor alosterici

Se constată deci că activitatea enzimei native este modulată de efectori, în funcţie de necesarul celular. Activitatea enzimei desensibilizate, în acest caz creşte, dar, reglarea este realizată doar prin mecanismele termodinamice şi cinetice „normale" (concentraţia locală de substrat şi de produs de reacţie direct, temperatură, pH etc).

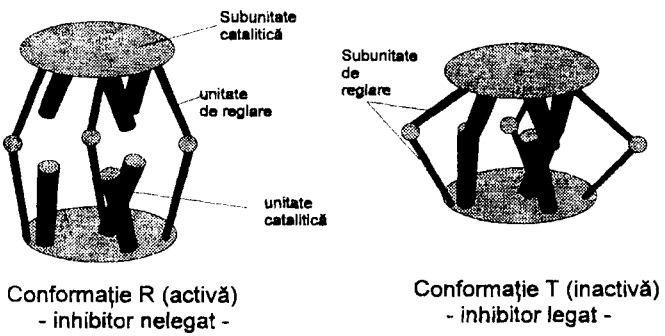


Fig. 4.121. Cele două conformaţii ale aspartat transcarbamilazei

Studii complexe, biochimice şi de difracţie de raze X, au stabilit că această enzimă este formată din 12 unităţi proteice. Şase dintre acestea sunt catalitice şi sunt organizate în două subunităţi plasate faţă în faţă, fiecare dintre acestea conţinând trei unităţi, fiecare capabile să lege cele două substraturi (aspartatul şi carbamilfosfatul). Celelalte şase unităţi sunt organizate în trei subunităţi reglatorii, plasate ca punţi între subunităţile catalitice. (*Fig. 4.121*). Subunităţile reglatorii au posibilitatea

să lege efectorii. Această enzimă prezintă doar două stări termodinamic stabile: o stare tensionată (T de la „tense")-inactivă catalitic și o stare relaxată (R- de la „relaxed") capabilă de actul catalitic. Legarea substraturilor pe situsurile catalitice, aduce molecula în conformația R, din care moleculele de inhibitor (CTP) disociază. Din contră, legarea inhibitorului aduce molecula în conformația T, când moleculele de substrat disociază de pe subunitățile catalitice. Competiția inhibitor - substrat este reglată de concentrațiile celor două tipuri de specii.

Aparența enzimei, așa cum rezultă din analizele de raze X permite evidențierea unui model mecanic similar.

4.7.3.2.1 Efecte cooperative la enzimele alosterice

Enzimele alosterice pot poseda unul sau mai multe situsuri de legare ale substraturilor și unul sau mai multe situsuri de legare ale efectorilor.

În cazul în care la atașarea unei molecule de ligand pe un situs multiplu modifică afinitatea celorlalte situsuri pentru ligand se vorbește de un efect cooperativ. Acest efect cooperativ se numește ***homotrop*** dacă se referă la același tip de situs. Dacă efectul de cooperativitate implică situsuri diferite (catalitic și alosteric), implicit liganzi diferiți, se vorbește de un efect ***heterotrop***.

Cooperativitatea reprezintă o modalitate suplimentară de modulare a afinității atașării unui ligand în funcție de gradul de ocupare al situsurilor la care acesta poate fi atașat. Hemoglobina este unul dintre primele exemple investigate, dar pe lângă aceasta, o serie de proteine manifestă cooperativitate în atașarea diferiților liganzi. Astfel de proteine îndeplinesc funcții de *enzime, receptori* sau *proteine de reglare* (represorul transcrierii operonului *lac*). Termenul de alosterie utilizat în special la enzime, poate fi folosit și pentru a desemna o proteină aptă să atașeze liganzi în mai multe situsuri.

Modele cooperative

Pentru a se putea explora comportamentul cooperativ al proteinelor s-au elaborat modele funcționale bazate pe premise simplificatorii. Dintre modelele elaborate se disting două: modelul concertat al lui MONOD, WYMAN, și CHANGEUX și modelul secvențial al lui KOSHLAND, NEMETHY și FILME

Modelul MONOD, WYMAN, și CHANGEUX (MWC)

În 1965 Jacques MONOD, Jeffries WYMAN și Jean - Pierre CHANGEUX au elaborat un model simplu al comportamentului alosteric, bazându-se pe câteva ipoteze simplificatoare:

♦ Proteinele alosterice sunt oligomeri.

♦ Proteina alosterică poate exista în două conformații alternative: una tensionată (T), cu afinitate redusă sau nulă față de substrat și una relaxată (R) cu afinitate ridicată pentru substrat. Cele două structuri prezintă diferențe la nivelul tuturor subunităților monomere. De aceea trecerea de la structură la alta, presupune bascularea conformațională a tuturor substructurilor, nefiind permise stările cu conformații diferite (R) și (T) ale monomerilor.[61] Între cele două structuri se stabilește un echilibru. Aceste structuri diferă prin numărul de legături care se stabilesc între subunități. Bariera energetică dintre cele două structuri este redusă pentru a putea fi compensată de energia eliberată ca urmare a atașării liganzilor. Afinitatea interacțiunii proteină substrat poate fi cuantificată prin intermediul constantelor globale de disociere ale ligandului de pe forma R respectiv forma T, adică K_R și K_T:

$$RL_n \longrightarrow R + nL \text{ cu } K_R = [R]\cdot[L]^n / [RL_n]$$

$$TL_n \longrightarrow T + nL \text{ cu } K_T = [T]\cdot[L]^n / [TL_n]$$

♦ Toate situsurile de legare sunt echivalente și în consecință vor avea aceeași afinitate pentru ligand.

În conformitate cu acest model, proteina poate atașa ligandul în ambele forme R sau T. Evident probabilitatea atașării de forma R este mai mare. Odată cu atașarea liganzilor forma R se consumă, prin urmare echilibrul T ⟵ R, (caracterizat prin **constanta alosterică** inițială, relevată în absența ligandului $L_0 = [T_0] / [R_0]$) se deplasează către forma R, cu afinitate mai mare pentru ligand. Prin urmare contanta alosterică se va reduce. Valoarea constantei alosterice L = [Ti] / [Ri], la atașarea celui de-al i-lea ligand din n posibili este dată de: $L = c^i \cdot L_0$, unde c este raportul constantelor de disociere: $K_R / K_T = c$. Evident valoarea sa va fi subunitară.

Exemplificând pe hemoglobină, vom avea următoarele date:

numărul situsurilor de legare: n = 4

$L_0 = 9000$ și

c = 0,014

În aceste condiții, constanta alosterică, raportul L, va avea valorile 9000, în condiții inițiale și 126; 1,76; 0,025 și 0,00035 odată cu legarea a

[61] Datorită trecerii simultane a subunităților din conformația T în R modelul MWC mai este cunoscut și sub numele de modelul concertat sau modelul de tip „totul sau nimic". Dacă de exemplu o proteină este trimerică, fiecare subunitate poate exista în conformațiile R sau T. Conform modelului MWC, întreaga proteină va putea exista în conformația T (TTT) sau R (RRR), nefiind permise structuri hibride de tipul TRT, TTR etc.

1; 2; 3 și respectiv patru molecule de oxigen per moleculă de hemoglobină. Se observă că odată cu scăderea valorilor constantei alosterice crește conținutul în forma R care are afintate mai mare pentru hemoglobină, aceasta crescând odată cu atașarea moleculelor de oxigen.

4.7.3.2.2. Influența efectorilor alosterici asupra enzimelor

Așa după cum s-a arătat enzimele alosterice sunt influențate de acțiunea indirectă a efectorilor alosterici asupra situsului activ. Acesta este un exemplu tipic de interacțiune heterotropă sau heteroalosterică. Modelul MWC explică acest tip de acțiune prin stabilizarea uneia dintre cele două forme: R în cazul efectorilor alosterici pozitivi și T în cazul efectorilor alosterici negativi. În acest mod se modifică echilibrul T ⇄ R, implicit constanta alosterică L.

În cazuri extreme un efector (activator în acest exemplu) poate deplasa echilibrul astfel încât forma R să fie majoritară iar forma T să fie neglijabilă. Dacă există un singur situs catalitic, cooperativitatea este abolită, enzima dobândind o comportare michaeliană, afinitatea față de substrat înregistrând creșteri importante. (*Fig.4.122.*). Este cazul ***piruvatkinazei***, o enzimă întâlnită în catabolismul glucidic (vezi volumul II), care transformă fosfoenolpiruvatul în piruvat. Această enzimă este alosterică, dar care dobândește o comportare michaeliană în prezența esterului fructozo–2,6-difosfat care acționează ca activator. De asemenea izocitrat dehidrogenaza, o enzimă întâlnită în ciclul acizilor tricarboxilici (vezi volumul II) este activată până la abolirea cooperativității de către AMP (acidul adenilic, vezi nucleotidele).

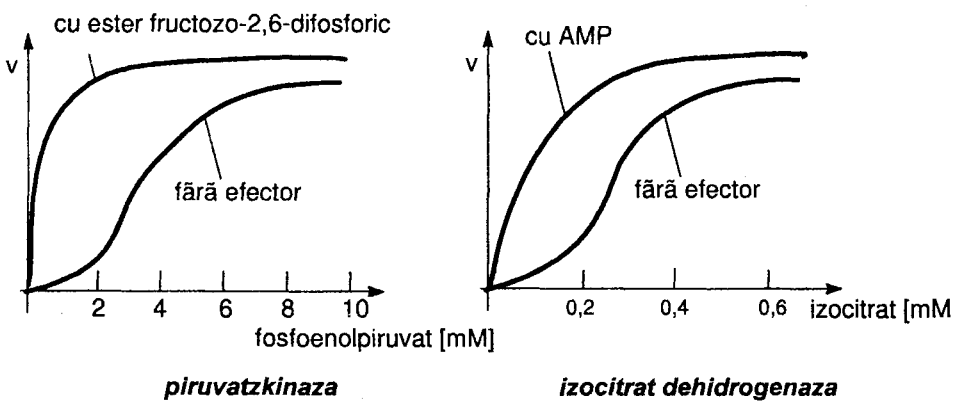


Fig. 4.122. Efectul efectorilor alosterici asupra unor enzime

4.7.3.2.3. Comportamentul de tip K și v.

Modelul MWC explică cele două cazuri de comportament ale enzimelor alosterice sub influența efectorilor. Modificarea afinității enzimei față de substrat, sub influența efectorului, intervine în cazul enzimelor de tip K. Efectorul acționează printr-un efect heterotrop. El influențează afinitatea atașării ligandului stabilizând una dintre stările T sau R. Ambele stări vor avea aceeași valoare pentru k_{cat} deci vor conduce la aceeași valoare a vitezei maxime de reacție.

În cazul enzimelor de tip v, substratul are aceeași afinitate pentru ambele stări. Cele două stări însă diferă prin valoarea parametrului v_{max}. În schimb efectorul se leagă preferențial de o anumită stare pe care o stabilizează, modificând valoarea constantei alosterice. În aceste condiții efectorul nu poate modifica afinitatea pentru substrat ci va influența doar viteza de reacție prin preferința pe care enzima o poate avea față de una din cele două forme.

Modelul secvențial al lui KOSHLAND, NEMETHY și FIRMER

Și acest model presupune existența celor două forme pentru subunitățile care atașează cooperativ ligandul R și T. Spre deosebire de modelul MWC, care admitea pentru proteina multimerică exclusiv două stări, modelul KNF admite că pe măsura legării are loc trecerea succesivă a subunităților de la conformația T la R, cea cu afinitate mai mare pentru ligand. Caracterul succesiv al trecerii subunităților agregatului multimeric din forma T în R a dat numele alternativ al modelului – modelul secvențial. În acest model deci, se admite existența formelor hibride. Ipotezele modelului sunt:

inițial proteina se găsește în starea T, unică.

Pe măsură ce are loc atașarea liganzilor, subunitatea care a legat ligandul, va induce o modificare conformațională în subunitatea sau subunitățile adiacente, care vor trece în starea R de afinitate mai mare.

Această teorie explică la rândul ei creșterea afinității proteinei în urma atașării ligandului (cooperativitate pozitivă). Acest model este mai plauzibil, decât modelul concertat deoarece presupune modificări conformaționale treptate, reduse ca intensitate la nivelul agregatului multimeric, spre deosebire de tranziția comutativă între stările globale R și T. Modelul KNF conține ideea **ajustării induse**, enunțată prima dată de către KOSHLAND, o teorie care vine în contradicție cu cea a **ajustării complementare rigide**, între proteină și ligand în general, între enzimă și substratul său în particular.

4.7.3.2.4. Cuantificarea cooperativității

Efectul de cooperativitate a fost intens studiat pe hemoglobină (vezi cap. 3). De o manieră similară, efectul poate fi cuantificat printr-o ecuație derivată de la formalizarea gradului de saturare al enzimei (proteinei) cu ligand (substrat sau efectori). Folosind ca ipoteză modelul simetric sau concertat al lui MONOD, WYMAN și CHANGEUX (vezi hemoglobina), se presupune o enzimă cu n situsuri de legare pentru substrat:

$E + nS \rightleftharpoons ES_n$ cu constanta de echilibru:

$$K = \frac{[E]\cdot[S]^n}{[ES_n]} \qquad [4.53]$$

Definind gradul de saturare Y:

$$Y = \frac{[ES_n]}{[E_0]}, \text{ respectiv } \textit{gradul de nesaturare } 1 - Y = \frac{[E]}{[E_0]}, \qquad [4.54]$$

prin eliminarea lui [E], între gradul de nesaturare și constanta de disociere se obține expresia:

$$1 - Y = \frac{K\cdot[ES_n]}{[S]^n\cdot[E_0]} \qquad [4.55]$$

sau prin înlocuirea expresiei gradului de saturare rezultă

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[S]^n}{K}, \qquad [4.56]$$

expresie care poate fi liniarizată prin logaritmare:

$$\ln\left[\frac{Y}{1-Y}\right] = n\cdot\ln[S] - \ln K \qquad [4.57]$$

Ecuațiile de mai sus sunt valabile pentru toate tipurile de comportamente alosterice (receptori, proteine de reglare, enzime).

Pentru a particulariza strict la enzime ecuația saturării proteinei, gradul de saturare Y se poate înlocui cu viteza de reacție. Evident gradul maxim de saturare (unitar), își va avea corespondentul în viteza de reacție maximă:

$$\frac{v}{v_{max} - v} = \frac{[S]^n}{K}, \text{ sau altfel scris: } v = \frac{v_{max}\cdot[S]^n}{K + [S]^n} \qquad [4.58]$$

În coordonate michaeliene (v = f([S])), variația lui v în funcție de variația concentrației substratului va avea o alură sigmoidală.

CAPITOLUL 5. Acizi nucleici

5.1. Introducere

Sunt compuși intracelulari cu o încărcătură informațională extraordinară. De regulă, se găsesc în asociații cu substanțe proteice, formând nucleoproteidele. Componentele neproteice, *acizii nucleici*, sunt compuși macromoleculari care provin din policondensarea nucleotidelor. Există două tipuri majore de acizi nucleici: acizii deoxiribonucleici (ADN) și acizii ribonucleici (ARN). Dintre aceștia, ADN deține informația necesară biosintezei tuturor biomacromoleculelor fabricate de un anume organism.

Fiecare celulă a unui organism conține întreaga informație necesară îndeplinirii tuturor funcțiilor organismului. Această informație se găsește înscrisă în ADN-ul nuclear numit *genom*, întocmai cum memoria unui calculator conține întreaga informație destinată bunei sale funcționări. Prin diviziune, oul fecundat, care reprezintă o singură celulă, își va multiplica informația genetică. Aceasta se va regăsi, pe măsura creșterii și dezvoltării, în multitudinea de celule nou apărute. Prin diferențierea celulară, care apare pe treptele superioare ale dezvoltării speciilor, celulele se specializează. Ele vor folosi doar părți din întreaga informație stocată. Între indivizii aceleiași specii informația genetică diferă puțin, aceste diferențe manifestându-se pe planul însușirilor fizice dar și comportamentale.

Informația genetică se găsește sub forma unui mesaj genetic, înscrisă prin intermediul unui alfabet format din patru litere, constituit din nucleotidele care formează ADN-ul nuclear. Succesiunea acestora determină individualitatea fiecărui organism. Genomul uman este format din aproximativ 3 miliarde de perechi de nucleotide ceea ce dacă ar fi înscrise pe pagini a 3000 de caractere ar încăpea pe 1000 de volume a 1000 de pagini.

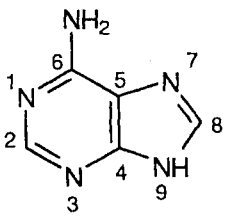
Genomul este organizat pe mai multe subunități, *genele*, care funcționează coordonat.

Transmiterea informației, de la ADN și până la catena polipeptidică care se sintetizează, se realizează prin intermediul acizilor ribonucleici (ARN), care sunt de mai multe tipuri, fiecare cu un rol bine determinat.

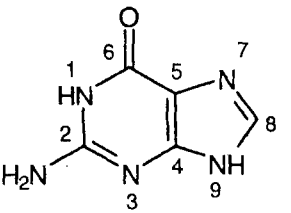
5.2. Constituenții acizilor nucleici

Acizii nucleici sunt produși de policondensare ai nucleotidelor. Nucleotidele, la rândul lor, sunt substanțe care conțin trei tipuri de molecule legate covalent: o bază azotată, o pentoză și acid fosforic.

Bazele azotate din constituția acizilor nucleici sunt în număr de cinci (cele mai frecvent întâlnite) și după structura heterociclică proprie pot fi sistematizate în baze purinice și baze pirimidinice.



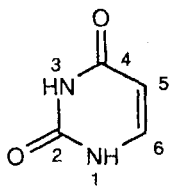
Adenina
(6-aminopurina)



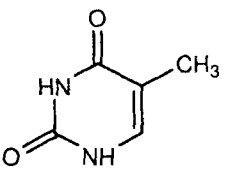
Guanina
(2-amino-6-oxipurina)

Fig.5. 1. Baze purinice (R): adenina (A) și guanina (G)

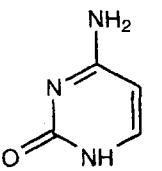
Bazele purinice (R), (*Fig.5.1.*) sunt derivați ai purinei: **adenina** (A) (6-aminopurina) și **guanina** (G) (2-amino–6-oxipurina)



Uracil
(2,4-dioxipirimidina)



Timina
(5-metil-2,4-dioxipirimidina)



Citozina
(4-amino-2-oxipirimidina

Fig.5.2. Baze pirimidinice (Y): uracil (U), timina (T) și citozina(C)

Bazele pirimidinice (Y), (*Fig.5.2.*) sunt derivați ai pirimidinei: **uracilul** (U)–2,4-dioxipirimidina, **timina** (T)–5-metil–2,4-dioxipirimidina și **citozina** (C)–4-amino–2-oxipirimidina

Timina se găsește doar în structura ADN, iar uracilul numai în structura ARN. Celelalte baze azotate se găsesc în ambele tipuri de acizi nucleici.

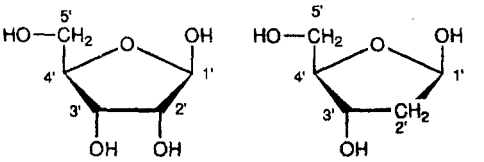


Fig. 5.3. Pentozele acizilor nucleici

Pentozele sunt de două tipuri: D-riboza şi D–2'-deoxiriboza (*Fig.5.3.*). Bazele azotate se leagă N-glicozidic de aceste pentoze formând *nucleozidele.* Bazele pirimidinice se leagă prin intermediul atomului de azot 1, iar cele purinice prin atomul N^9. Pentru evitarea confuziilor legate de numerotarea atomilor de carbon, în cazul pentozei aceştia se

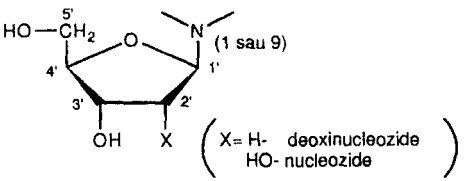


Fig. 5.4. Structura de principiu a unei nucleozide

notează cu numere prime (')(*Fig.5.4.*). Numele nucleozidelor se formează din rădăcina numelui bazei azotate la care se adaugă sufixul *idina* pentru cele pirimidinice respectiv *ozina* pentru cele purinice. Deoxiribonucleozidele primesc sufixul *deoxi* (*Tab. 5.1.*)

Tab.5.1. Formarea numelui nucleozidelor

Baza azotată	Ribonucleozide	Deoxiribonucleozide
Uracil	Uridina	-
Timina	-	Deoxitimidina
Citozina	Citidina	Deoxicitidina
Adenina	Adenozina	Deoxiadenozina
Guanina	Guanozina	Deoxiguanozina

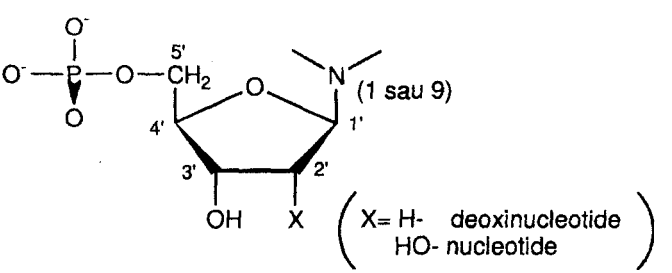
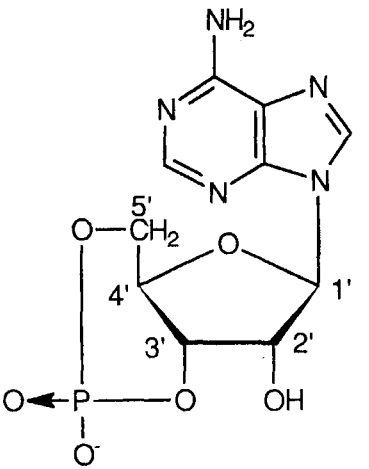


Fig.5. 5. Structura de principiu a unei nucleotide



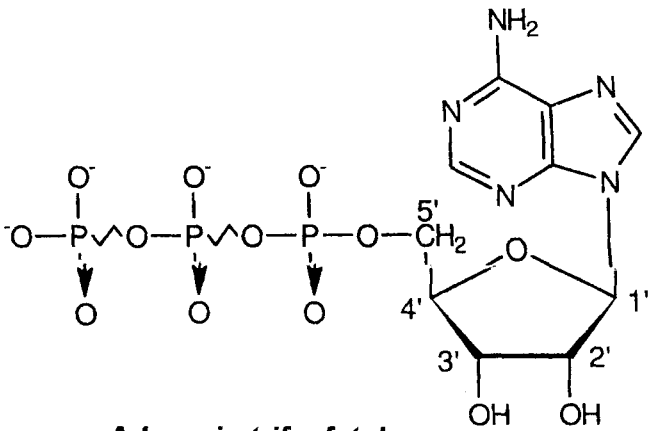
Adenozin monofosfatul ciclic
(cAMP)

Fig.5.6.

Acidul fosforic, se leagă fosfoesteric de hidroxilul 5' rezultând în acest mod *nucleotidele*, monomerii sau elementele de bază (cărămizile) ale acizilor nucleici. (*Fig. 5.5.*). Prezența acidului fosforic, conferă caracterul acid atât nucleotidelor cât și catenelor polinucleotidice. Policondensarea nucleotidelor se face prin intermediul acidului fosforic, care stabilește o nouă legătură fosfoesterică cu hidroxilul de la C3' al altei nucleotide. Denumirea acestor nucleotide se poate face în mai multe moduri. O primă posibilitate este aceea de a utiliza numele de *acid* + (prefixul *deoxi*) + rădăcina numelui bazei + sufixul *ilic*, pentru bazele purinice, respectiv *idilic* pentru cele pirimidinice. Astfel se poate exemplifica: *acidul* (*deoxi*)guan*ilic*, *acidul deoxi*tim*idilic*, *acidul* ur*idilic* etc. O altă posibilitate este de a denumi nucleotidele ca esteri ai acidului fosforic (mono) cu nucleozidele: adenozin–5'-monofosfat, deoxitimidin–5' monofosfat etc. sau de a utiliza prescurtări ale acestor esteri (AMP = adenozin–5' monofosfat, dAMP = deoxiadenozin–5'-monofosfat, CMP-citidin monofosfat etc).

Există și nucleotide „speciale" care se abat de la structura de bază mai sus enunțată. Acestea sunt fie intermediari în sinteza polinucleotidelor, fie îndeplinesc alte funcțiuni. Astfel amintim *cAMP sau adenozin monofosfatul ciclic*, care conține două legături de tip fosfoesteric la pozițiile 3' și 5' (*Fig.5.6*). Această substanță funcționează ca un mediator al acțiunii hormonale fiind interpus între hormon și enzima specifică asupra căruia acesta acționează. În prezența hormonului se activează

AMP ciclaza, enzima care mediază formarea cAMP din ATP (vezi mai departe).



Adenozin trifosfatul
(ATP)

Fig.5.7.

Difosfo- și trifosfonucleozidele sunt principalele substanțe folosite de materia vie ca tampon energetic. Legătura fosforanhidridică are o energie liberă ridicată (ΔG' = 7 kcal/mol). Reprezentantul tipic al acestei categorii de substanțe este adenozintrifosfatul (ATP), care posedă două astfel de legături numite macroergice. În formulele structurale, legăturile macroergice se reprezintă prin tildă („~ „) - *Fig. 5.7.*

Pe lângă ATP există și ADP, precum și toți ceilalți nucleozid di- și trifosfați.

Dintre însușirile nucleotidelor amintim:

- caracterul acid (la pH = 7 toate grupările acide ale acidului fosforic sunt ionizate)
- absorbția radiației UV de 260 nm
- hidroliza nucleotidelor la nucleozide se poate realiza intracelular prin acțiunea 5'-nucleotidazelor
- pe lângă rolul lor primordial de a intra în constituția acizilor nucleici, nucleotidele pot fi întâlnite ca tampoane energetice (XTP și XDP - X- bază azotată), ca mesageri ai acțiunii hormonale, precum și în calitate de coenzime sau precursori fie în reacții anabolice, fie în reacții catabolice.

5.3. Structura acizilor nucleici

5.3.1. Acizii deoxiribonucleici (ADN)

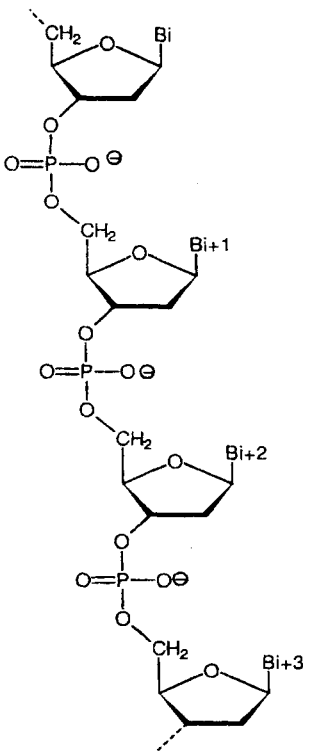


Fig.5. 8. Structura primară a ADN

Reprezintă baza moleculară a conservării și transmiterii informației ereditare, a diferențierii și reglării celulare, a menținerii și perpetuării caracterelor, și totodată a modificărilor naturale (spontane) sau induse.

În imensa majoritate a cazurilor (excepție fac câteva virusuri), ADN-ul are o structură bicatenar elicoidală (dublu helix).

Structura primară a ADN-ului este dată de secvența de nucleotide, care sunt unite prin legături 3'–5' fosfodiesterice. De fapt structura primară a ADN-ului este similară cu structura primară a ARN-ului deosebirea fiind la tipul de pentoză și la existența exclusivă a: uracilului în moleculele de ARN și a timinei în molecula de ADN.

Datorită ionizării restului de acid fosforic, ADN-ul se comportă ca un macroanion.

În ADN nucleotidele nu participă în cantități echimolare. Totuși între bazele azotate componente s-au stabilit anumite raporturi. *Tab. 5.2.* redă câteva dintre acestea, stabilite pe diferite specii. S-a constatat, și datele prezentate o confirmă, că:

[A] / [T] ≈ [G] / [C] ≈ 1 ; ([A]+[G]) / ([T]+[C]) ≈ 1. Raportul ([A]+[T]) / ([G]+[C]) poartă numele de *indice de specificitate.* Aceste raporturi sunt cunoscute sub numele de relațiile sau regulile lui CHARGAFF, autorul determinărilor cantitative (1950).

5.3.1.1. Structura secundară a ADN-ului

Modelul ideal al structurii secundare a ADN, a fost creeat de James WATSON și Francis CRICK în 1953, pe baza rapoatelor lui CHARGAFF și a datelor obținute prin studiul structurii ADN prin difracție de raze X.

Tab. 5.2. Rapoarte între concentrațiile bazelor azotate în ADN provenit din diferite specii

Sursa	[A]/[G]	[T]/[C]	[A]/[T]	[G]/[C]	[R]/[Y]
Bou	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1
Om	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0
Găină	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
Somon	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Grâu	1,22	1,18	1,00	0,97	0,99
Drojdie	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0
Haemophillus influenzae	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0
E. Coli K-12	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0
Bacilul tuberculozei aviare	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1
Serratia marcescens	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9
Bacillus schatz	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0

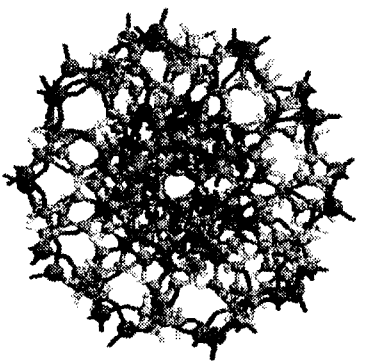


Fig.5.9. Vedere de sus a unui duplex ADN

Potrivit acestui model, ADN se prezintă ca o structură bicatenară, antiparalelă, dublu elicoidală de dreapta, ambele catene fiind înfășurate pe aceeași axă. Diametrul dublului helix este de 20 Å, pasul helixului este de 34 Å, cu 10 nucleotide per pas.

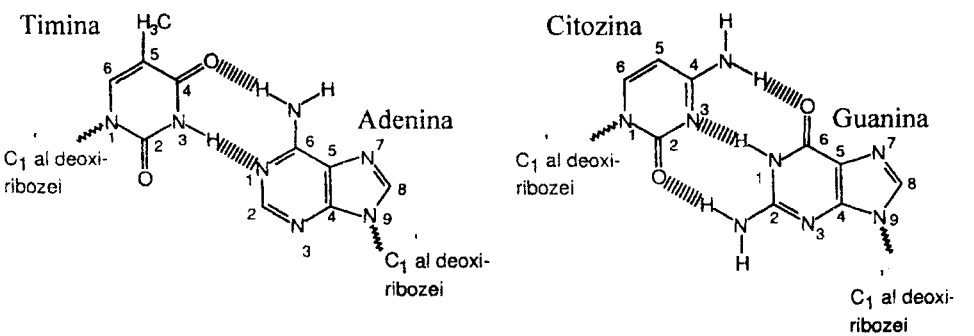


Fig.5.10. Împerecherea bazelor complementare din nucleotidele ADN prin legături de hidrogen

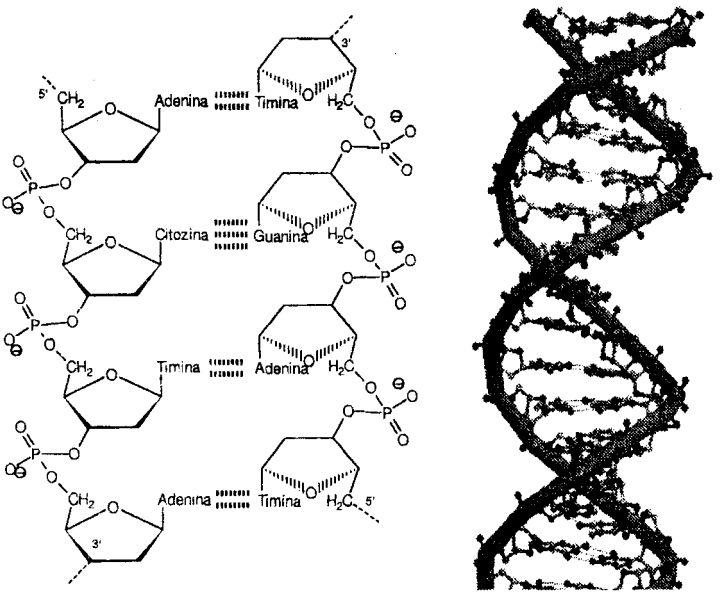


Fig.5.11. Stabilizarea duplexului ADN prin legături de hidrogen

Bazele azotate se află dispuse înspre interior, (*Fig.5.9.*), cu planul perpendicular pe axa comună de rotație, decalate între ele cu un unghi de 36°, iar moleculele de deoxiriboză au planul paralel cu axa de rotație. Dispunerea interioară a bazelor azotate este favorizată de hidrofobicitatea conferită de electronii π delocalizați ai nucleelor acestor structuri. Stabilitatea helixului este asigurată prin legături de hidrogen între perechile A–T și G–C (câte două și respectiv trei pentru fiecare pereche. *Fig. 5.10.*) Aceste legături de hidrogen nu se pot stabili decât dacă cele două catene polideoxiribonucleotidice sunt antiparalele (*Fig.5.11.*)

În dublul helix se delimitează două caneluri, una mare și alta mică, care urmează traseul celor două catene antiparalele. Structura descrisă mai sus se referă la cel mai des întâlnit tip de ADN și anume la structura de tip B. Pe lângă aceasta, au fost identificate și alte forme sub care se poate prezenta ADN-ul.

5.3.1.2. Mobilitatea confo r maţională a ADN-ului

Studiul sistematic, prin difracție de raze X, efectuat pe cristale de ADN a fost impulsionat de descoperirea și perfecționarea tehnicilor de sinteză chimică, și de biosinteză „in vitro" a catenelor oligonucleotidice, de amplificare a numărului acestor fragmente.

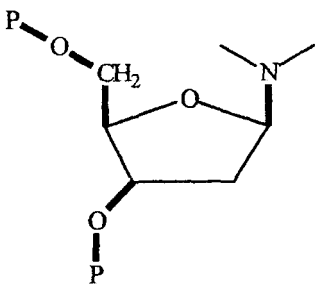


Fig.5.12.

Rezultatele observațiilor au confirmat modelul propus de WATSON și CRICK, dar în același timp au evidențiat mobilitatea acestuia. Dublul helix se poate îndoi, răsuci, despirala și retrospirala.

Rezoluția la scară atomică a difractometrelor de raze X a relevat că într-o nucleotidă componentă a unei oligo- sau polideoxiribonucleotide dublu catenare există șase tipuri de legături care permit o rotație limitată, justificând mobilitatea catenară (*Fig. 5.12.*, legăturile îngroșate).

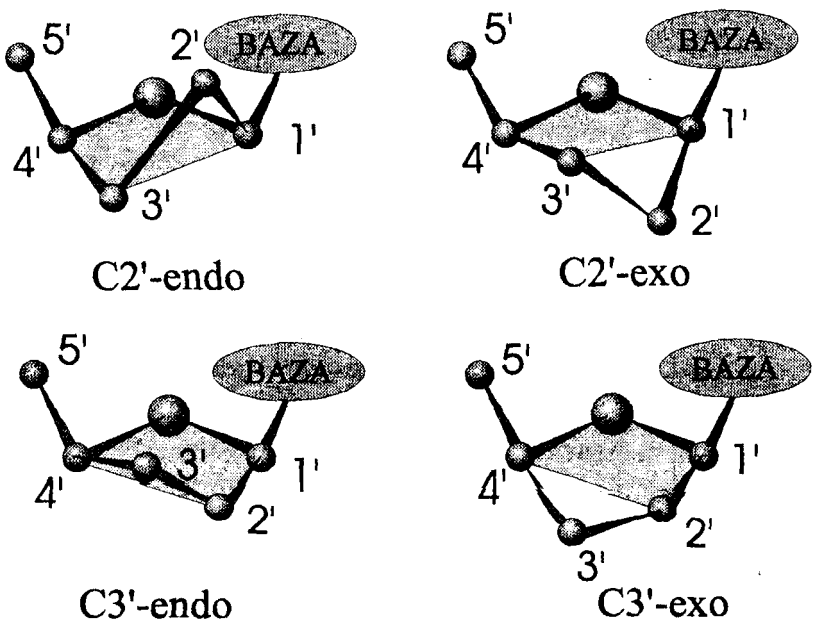


Fig.5.13. Conformații ale nucleului pentozic din nucleotide

Astfel, prin analiza unui dodecamer, DICKERMAN, relevă o mare variabilitate a unghiului de decalare a nucleotidelor, care se întinde în plaja 28° – 42°, față de valoarea fixă dată de modelul WATSON - CRICK (36°). Mai mult, el a observat că bazele azotate perechi deviază adesea de la planaritate întocmai ca și palele unei elice. Mărimea deviațiilor de la valorile modelului inițial, depind atât de condițiile de mediu (pH, temperatură, tărie ionică), dar și de secvența particulară a nucleotidelor în catenă.

În ceea ce privește inelul furanozic, al deoxiribozei, acesta nu este plan. El se găsește în diferite conformații, patru dintre acestea fiind pre-

zentate în *Fig.5.13.* În structura de tip B a ADN-ului, cea mai favorizată formă este conformația C2'-endo.

Planul bazelor azotate este perpendicular pe planul pentozei. Deoarece legătura glicozidică este mobilă, pot apare conformeri sin respectiv anti (*Fig.5.14*). În cazul nucleotidelor pirimidinice, conformația sin este defavorizată energetic pe temeiul repulsiei dintre atomii de oxigen ai ciclului furanozic respectiv cel legat în poziția 2 a nucleului pirimidinic. În cazul nucleotidelor purinice, ambii conformeri sunt stabili. Cea mai răspândită formă este anti- găsită în structura de tip B (vezi mai departe), în timp ce conformația sin se găsește în structura de tip Z.

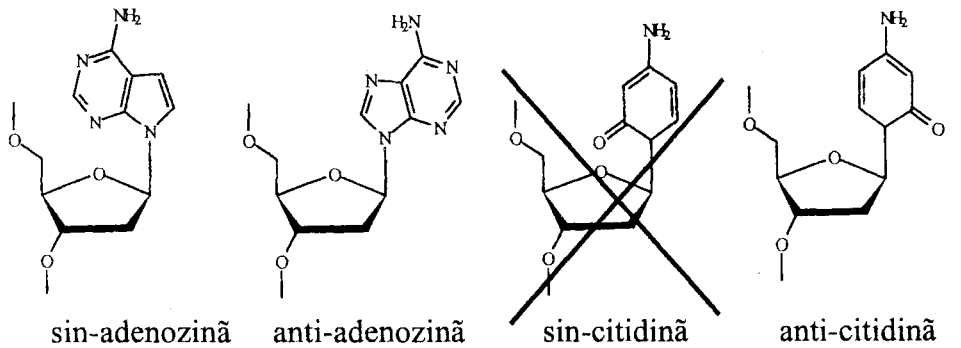


Fig.5.14. Conformații permise și interzise pentru nucleotide, rezultând din rotația în jurul legăturii glicozidice

Posibilitatea acestor deformații ale dublului helix are o remarcabilă semnificație biochimică, deoarece permite formarea speciilor de ADN circular precum și „mularea" reciprocă, stabilă a ADN-ului de proteinele nespecifice - histonele sau temporară de enzime sau diferiți factori proteici. Pe lângă aceasta, trebuie menționat că gradul mare de compactitate al ADN-ului, care îi permite să existe în celulă, în ciuda lungimii sale imense în stare nepliată, nu este posibil decât pe suportul mobilității sale conformaționale.

5.3.1.3. Tipuri necanonice de duplexuri ADN

Structura canonică, la baza căreia stă modelul WATSON-CRICK, este cunoscută sub numele de structură B sau B-ADN. De fapt aceasta este forma predominantă sub care se pare că se găsește „in vivo" ADN-ul.

Pe lângă acestea au mai fost identificate în experimente realizate „in vitro" încă două tipuri de ADN respectiv A și Z.

5.3.1.3.1. Structura de tip A (A-ADN-ul)

Reprezintă o modificare a dublului helix B-ADN care se produce în condiții de deficit de apă, astfel încât hidratarea moleculei(lor) nu se poate face complet. Din această cauză dublul helix devine mai compact față de axa principală dar mai larg (în diametru), conformația inelului piranozic se va modifica în C3'-endo, planul bazelor azotate nu va mai fi perpendicular pe axa dublului helix, fiind rotit cu aproximativ 19°. De asemenea bazele azotate vor fi distribuite spre periferia dublului helix. Se pare că astfel de structură este adoptată de hibrizii ADN-ARN precum și de zonele dublu helicate din ARN. Explicația acestui comportament rezultă din prezența hidroxilului din poziția 2' la resturile de riboză ale ARN.

5.3.1.3.2. Structura de tip Z (Z-ADN)

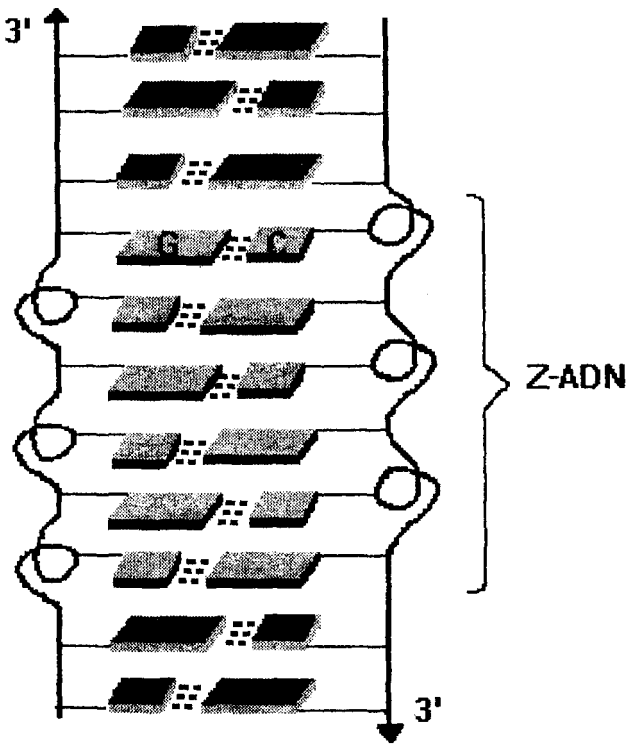


Fig.5. 15. Modalitatea de formare a structurii Z-ADN

A fost identificată de către Alexander RICH de la Massachusets Institute of Technology în cursul determinărilor structurale realizate pe

fragmente deoxiribonucleotidice sintetice cu secvența CGCGCG. Acestea cristalizează în duplexuri antiparalele cu o conformație dublu helicoidală de stânga mai puțin compactă decât structurile B. Aceasta se datorează alternanței bazelor purinice cu cele pirimidinice și în special resturilor guaninice care se acomodează ușor cu conformația sin. Într-o astfel de conformație inelul ribozic basculează la structura C3'-endo.

Topologic, este posibil ca guanina să basculeze în conformația sin. În această conformație, pentru realizarea împerecherii cu citozina ar fi necesar ca aceasta să își rotească planul cu 180°. Ori această mișcare nu este permisă datorită imposibilității adoptării de către citidină a conformației sin. Prin urmare, în această situație este nevoie ca întreaga catenă care conține citidina să se rotească la nivel ribofosforic (să facă o buclă). Succesiunea alternantă GC pe o catenă și implicit pe cealaltă va conduce la un mers zigzag al catenelor deoxiribofosforice. Astfel, în zone din ADN care conțin motivul repetitiv conformația Z poate fi adoptată. Trecerea de la conformația B la Z modifică helixul de dreapta într-unul de stânga, în care scheletul ribofosfat merge după un zigzag de unde și numele acestei forme. În *Tab. 5.3.* se prezintă comparativ câteva caracteristici definitorii ale modelelor A, B și Z ale ADN (*Fig.5.16*).

Tab. 5.3. Principalele caracteristici ale diferitelor tipuri de duplexuri ADN

Caracteristica	Tip de dublu helix		
	A	B	Z
Proporții globale	scurt și gros	lung și subțire	foarte elongat, subțire
Lungime / pereche de baze	2,3 Å	3,32 Å ± 0,19 Å	3,8 Å
Diametru helix	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Sensul de rotație al helixului	de dreapta	de dreapta	de stânga
Perechi de baze / spiră	~11	~10	12
Unghi de rotație / pereche de baze	33,6°	35,9° ± 4,2°	–60°/2
Pasul helixului	24,6 Å	33,2 Å	45,6 Å
Deplasarea planului bazelor față perpendicularitate	+19°	–1,2° ± 4,1°	–9°
Poziția axei dublului helix	În canelura mare	Între perechile de baze	În canelura mică
Proporții ale canelurii mari	Foarte îngustă dar foarte adâncă	Largă, dar cu adâncime intermediară	Deplasată spre exterior
Proporții ale canelurii mici	Foarte largă dar puțin adâncă	Îngustă cu adâncime intermediară	Foarte îngustă dar foarte adâncă
Conformația legăturii glicozidice	anti	anti	sin pentru G

5.3.1.4. Comportarea dublului helix ADN în soluţie

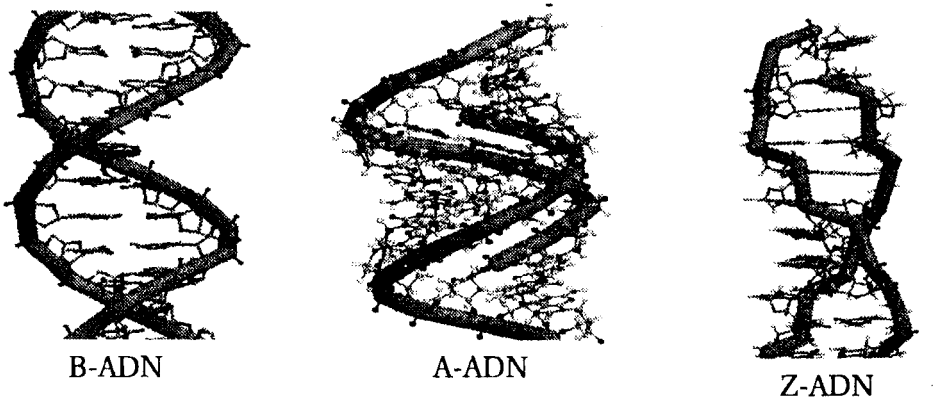


Fig.5.16. modelele formelor A, B şi Z ale duplexurilor ADN

În soluţie apoasă precum şi „in vivo", structura dublu helicată a ADN, în conformaţie majoritară B este dinamică, răspunzând fluctuaţiilor termice care îi modifică local conformaţia. Atât scheletul ribofosforic, cât şi bazele azotate se mişcă elastic cu perioade de ordinul nanosecundelor. Local, această mobilitate este influenţată de secvenţa nucleotidică particulară. De aceea dublul helix, departe de a fi o structură rigidă, apare cu o conformaţie mobilă aparent dezordonată. Această structură permite, în anume momente, în zone precis delimitate, prin conformaţii optime, interacţiuni tranzitorii cu substanţe proteice, care în majoritatea cazurilor modulează procesele de transformare care au loc la nivelul ADN-ului (replicare, transcriere etc).

Tot legat de mobilitatea structurală în soluţie trebuie amintit cazul aşa numiţilor **agenţi de intercalare**. Chimic, aceştia sunt substanţe aromatice cu nuclee condensate, prin urmare plane. In contact cu ADN-ul în soluţie, aceste substanţe pătrund între planurile bazelor azotate unde îşi stabilizează poziţia prin interacţii hidrofobe cu nucleele heterociclice ale acestor baze. Formarea în acest mod a complecşilor de intercalare, pe de o parte reduce mobilitatea dublului helix rigidizându-l, iar pe de altă parte duce la pierderea elicităţii în zona de intercalare, implicit creându-se tensiuni la nivelul scheletului fosforibozic. (Detalii suplimentare în Vol. II la secţiunea mutaţii). În plus, agenţii de intercalare afectează interacţiunea ADN-ului cu proteinele specifice (echipamentul proteic al proceselor de replicare, transcriere etc.) perturbând procesele în care aceste proteine sunt implicate.

5.3.1.5. Denaturarea şi renaturarea ADN

În anume condiţii de temperatură, pH şi tărie ionică acizii deoxiribonucleici îşi pot pierde structura bicatenară, cele două catene separându-se. Acest fenomen este cunoscut sub numele de *denaturare.* În cazul în care intensitatea cu care acţionează aceşti factori nu afectează structura primară a celor două catene, prin îndepărtarea agentului denaturant (răcire, aducerea pH-ului în limitele normal fiziologice, îndepărtarea ionilor) structura bicatenară se reface, fenomenul numindu-se *renaturare.*

Evoluţia denaturării, respectiv a renaturării poate fi monitorizată spectrofotometric prin monitorizarea absorbanţei la 260 nm. La această lungime de undă absorb bazele azotate. In structura dublu helicată, datorită mascării bazelor, absorbanţa are o valoare relativ redusă. Pe măsură ce catenele se îndepărtează reciproc, creşte şi valoarea absorbanţei, efectul fiind cunoscut de specrometrişti sub numele de *efect hipercrom* sau *deplasare hipercromă.* Prin analogie cu punctul de topire al solidelor, respectiv cu cel al enzimelor (vezi efectul temperaturii asupra structurii - activităţii enzimelor), se poate defini un *punct de topire al ADN-ului (p.t.).* Acesta este temperatura la care se înregistrează jumătate din variaţia totală a absorbanţei. Desigur relevarea acestuia se face pe baza înregistrării variaţiei absorbanţei în funcţie de temperatură (*Fig.5.17.*).

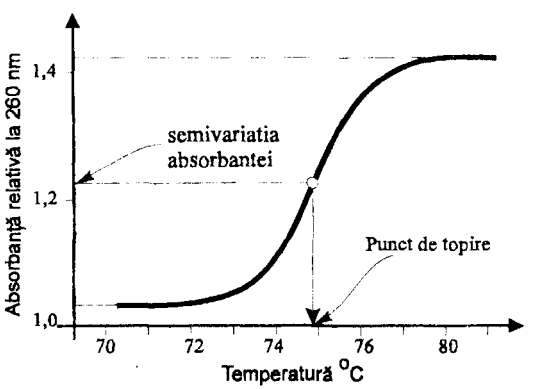


Fig.5.17. Efectul hipercrom al ridicării temperaturii unei soluţii de duplex ADN

Punctul de topire (p.t.) este specific fiecărui ADN fiind determinat de raportul G+C / A+T. Cu cât această valoare este mai mare cu atât interacţiunile dintre catene sunt mai puternice şi în consecinţă punctul de topire va fi mai ridicat.

Trebuie subliniat că punctul de topire este corelat direct cu concentrația ionilor. Acesta, pentru că în prezența ionilor, are loc o neutralizare a sarcinilor grupărilor fosfat, care le anulează repulsia intercatenară reciprocă, rezultând în acest mod o stabilizare a structurii dublului helix. Experimental s-a constatat că în apă distilată p.t al ADN-ului este situat la temperatura camerei. Odată cu creșterea concentrației ionice, crește și punctul de topire. Pentru o soluție 0,2M de Na^+, s-a stabilit o relație cantitativă, liniară în concentrația perechilor G+C, pentru punctul de topire: p.t. = 69,3 + 0,41 [%G+C].

pH-ul are o influență nefavorabilă asupra stabilității macrostructurii ADN. Prin protonarea respectiv deprotonarea moleculei, are loc destabilizarea sistemului intern de legături de hidrogen, cu pierderea dublei helicități. Acest proces este practic complet în afara plajei de pH 2,3 - 11,5. De notat, că în cazul ADN-ului, denaturarea produsă de baze este reversibilă, în timp ce acizii, prin ruperea legăturii glicozidice consecutivă protonării, duc la denaturare ireversibilă (vezi hidroliza acizilor nucleici).

Renaturarea, este procesul invers denaturării. În evoluția sa, cele două catene se vor alinia reciproc, stabilind interacțiunile complementare. Viteza renaturării este dependentă de lungimea, concentrația ADN și de timp. Temperatura acționează la un nivel optim, difuzia macromoleculelor fiind direct dependentă de temperatură, dar peste o anumită limită se poate declanșa „topirea" duplexului. Cinetica renaturării este descrisă de modelul bimolecular:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2 \quad \text{sau sub formă integrată:} \quad \frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0 t}$$

Procesele de denaturare-renaturare au ca aplicație formarea hibrizilor ADN-ADN sau ADN-ARN, utilizați în tehnicile de manipulare a acizilor nucleici.

5.3.1.6. Hibridizarea acizilor nucleici.

După cum se cunoaște, atât ARN-ul cât mai ales ADN-ul conțin zone dublu catenare. La încălzire la 100°C sau în prezența unor agenți denaturanți are loc un proces de desfacere a punților de hidrogen care asigură interacțiunile intercatenare, proces cunoscut sub numele de **denaturare**. Procesul este în anumite limite reversibil. De aceea, opusul său, refacerea interacțiunilor intercatenare și implicit a structurii bicatenare a acidului nucleic, în totalitate sau pe porțiuni, poartă numele de **renaturare** sau **hibridizare**. In practică acest fenomen apare la menți-

nerea un timp suficient de lung a partenerilor de hibridizare la temperatura de 65°C. Viteza renaturării depinde de probabilitatea întâlnirii secvențelor complementare, implicit de concentrația speciilor care conțin aceste secvențe. De aceea viteza „de reacție" poate servi ca măsură a concentrației acestor specii. Combinarea pe bază de stereocomplementaritate a bazelor poate produce hibrizi (de unde și denumirea) ADN - ADN, ARN-ARN sau mai ales ADN-ARN, pentru că împerecherea bazelor se poate face pe întreaga structură a celor două catene sau pe porțiuni ale acesteia.

Importanța analitică a procesului rezultă fără dificultate, în identificarea secvențelor comune a două fragmente de ADN care pot aparține unor indivizi diferiți. Precizia și sensibilitatea metodei permite identificarea unor substanțe existente în concentrații de până la o moleculă pe celulă. Dintre problemele care le rezolvă hibridizarea amintim:

- determinarea numărului de copii ale unei secvențe particulare de nucleotide care există într-un genom.
- determinarea secvențelor comune ale aceluiași tip de genă care aparțin la specii diferite.
- determinarea genelor exprimate într-o anume celulă prin hibridizare ADN - mARN, știut fiind că nu toate genele dintr-o celulă își vor găsi expresia în sub forma unei substanțe proteice, implicit a mARN-ului corespunzător.
- determinarea exactă a regiunilor de contact între ADN și ARN-ul celular cu stabilirea exactă a situsurilor de start și stop și mai mult, între acestea determinarea poziției secvențelor intercalate (a intronilor) care ulterior vor fi îndepărtate în procesul de excizie – splicing (vezi vol. 2 transcrierea).

Practic, tehnica de hibridizare a acizilor nucleici folosește o monocatenă ADN numită sondă nucleotidică sau pur și simplu sondă care va „detecta" fragmente complementare. Sonda trebuie să fie în mod obligatoriu marcată fie radioactiv fie chimic, pentru a putea fi vizualizată odată cu fragmentul complementar de care se va atașa după ce este introdusă într-un mediu care conține material nucleic (fie ADN fie ARN). După o încălzire în timpul căreia are loc desfacerea tuturor duplexurilor are loc hibridizarea sau combinarea catenelor complementare, proces la care va participa și sonda. Împerecherea catenelor nu necesită o complementaritate strictă, procesul având loc și în condițiile unor catene complementare doar pe porțiuni. Un rol important în hibridizare,

atunci când gradul de complementaritate este redus, îl are temperatura. Cu cât aceasta este mai ridicată, selectivitatea procesului este mai ridicată, și invers.

Sonda nucleotidică se obține prin **clonare** (PCR, sau clonare „in vivo" – vezi în continuare) plecând de la fragmente de restricție (obținute în urma clivării cu enzime de restricție sau de la fragmente complementare (**cADN**) obținute din mARN, sub influența reverstranscriptazei[62]. Uneori, în cazul fragmentelor scurte, acestea se pot obține prin **sinteză chimică**.

Marcarea radioactivă a sondei nucleotidice se poate face principial prin două metode: marcare internă și marcare externă.

a) ***marcarea internă*** (*Fig.5.18.*) se realizează prin biosinteza catenei sondei în prezență de ADN polimerază, utilizând deoxiribonucleozid trifosfați, marcați la fosforul α cu ^{32}P. Această metodă se poate realiza la rândul ei prin două variante: (1) deplasarea breșei și (2) amorsajul aleatoriu.

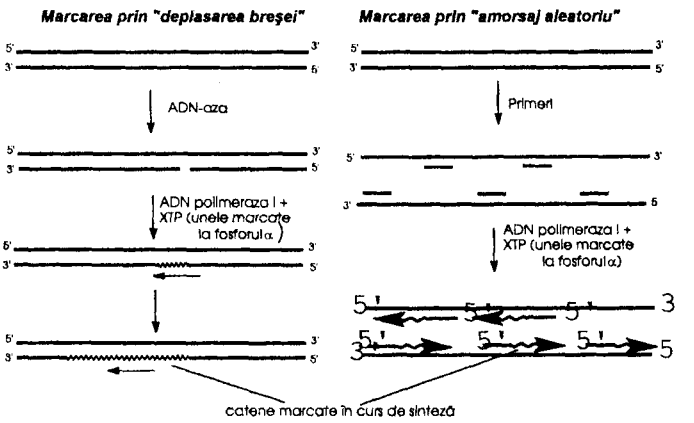

Marcarea prin "deplasarea breşei"
Marcarea prin "amorsaj aleatoriu"
ADN-aza
Primeri
ADN polimeraza I + XTP (unele marcate la fosforul α)
ADN polimeraza I + XTP (unele marcate la fosforul α)
catene marcate în curs de sinteză

Fig. 5.18. Marcarea internă a sondelor nucleotidice

(1) Marcare prin ***deplasarea breșei*** (*nick translation*): prin tratarea unui fragment ADN sursă cu *ADN-aza I*, în prezența ionilor Mg^{2+}, se creează breșe într-o catenă ADN. Dispunerea pe catenă a acestor breșe este aleatorie. Extremitățile 3' ale acestora pot servi ca reactant pentru reacția de policondensare la care mai participă nucleozid trifosfați (unii dintre ei marcați la Pα) și desigur *ADN-polimeraza I*. În acest mod, se

[62] Reverstranscriptaza folosește o matriță de ARN pentru a sintetiza monocatene de ADN. Vezi tehnici de inginerie genetică Vol. II.

vor obține catene identice cu cele clivate inițial, dar care vor avea încorporați atomi ^{32}P.

(2) Marcarea prin **amorsaj aleatoriu** (*random priming*) utilizează hexanucleotide sintetice, disponibile comercial, cu rol de primeri în sinteza catenelor marcate. Hexanucleotidele își vor avea corespondentul complementar în catenele[63] ADN din care se obține sonda.

După decuplarea catenelor helixului prin încălzire, la răcire are loc atașarea primerilor. ADN polimeraza, în prezența nucleozidtrifosfaților (din care unii marcați va sintetiza noi catene plecând de la pimerii existenți. Diferența între cele două metode este că în cazul amorsajului aleatoriu se obțin fragmente de ADN de lungimi diferite.

b) marcarea externă se realizează la capetele 5', folosind în acest scop polinucleotidkinaza codificată de genomul bacteriofagului T4 și extrasă din bacterii E. coli infectate cu acest fag. Fosfatul radioactiv se va atașa în poziția 5' și provine din ATP-ul marcat la fosforul α.

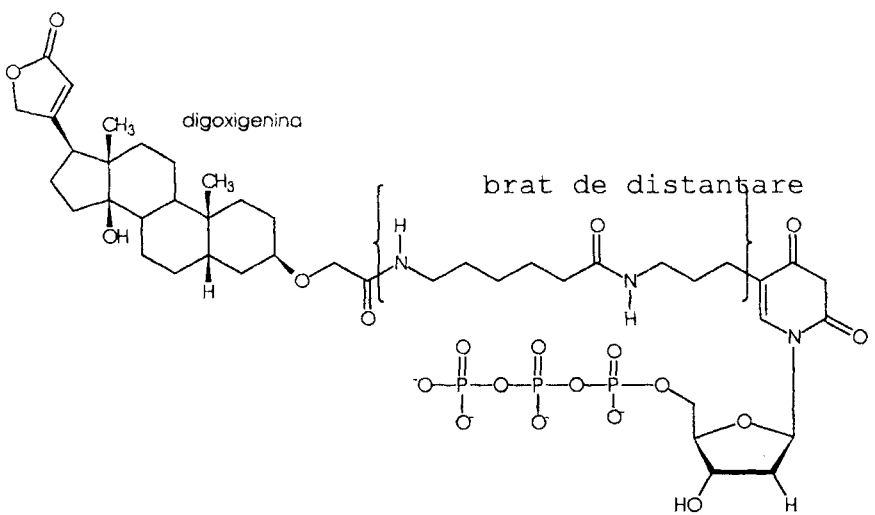


Fig. 5.19. Nucleotidă marcată chimic, detectabilă imunologic

Această metodă se utilizează cu fragmente ADN cu până la 100 de nucleotide, deoarece peste această valoare conținutul de fosfor radioactiv per catenă ar deveni prea mic (avându-se în vedere că există doar un ^{32}P la fiecare catenă).

---

[63] probabilitatea de a întâlni un fragment de secvență dată de lungime n este $1/4^n$ - în cazul nostru 1/4096 adică lungimea medie a unui fragment care poate conține secvența hexanulcleotidică este de 4096 de nucleotide).

Marcarea chimică, este mai complexă, însă are avantajul evitării contaminării radioactive. De regulă marcarea chimică se face cu o componentă pentru care se dispune de un anticorp (*Fig.5.19.*). Acest anticorp conține atașată o enzimă. După separarea electroforetică a fragmentelor de analizat, are loc hibridizarea cu sonda nucleotidică. După hibridizare, se îndepărtează prin spălare excesul de sondă, și în mediu se introduce anticorpul, mediul se incubează suficient pentru ca reacția să aibă loc și apoi se introduce substratul pentru enzima atașată de anticorp. Locul existenței enzimei (locul unde s-a atașat anticorpul) se detectează de regulă prin schimbarea culorii produsului de reacție prezența hibridului.

Identificarea fragmentelor hibridizate prin transfer (blotting)

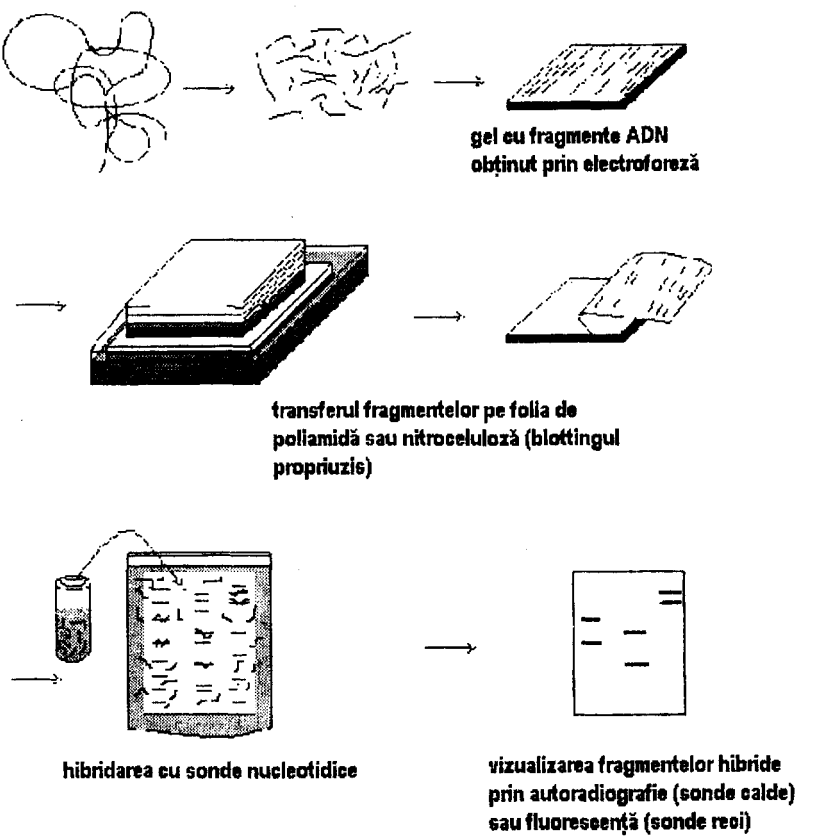


Fig.5. 20. Schema tehnicii „blotting"

Capacitatea hibridizării, ca instrument de lucru, de a realiza identificarea unor fragmente complementare cu sonda nucleotidică, își găsește valorificarea prin combinarea cu separarea electroforetică. Fragmentele oligo- sau polinucleotidice supuse analizei sunt separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau agaroză (cele peste 20 kD). Aceste fragmente nu pot fi supuse operației de hibidizare cu sonda nucleotidică pe gelul de separare, deoarece pe de o parte fragmentele nucleotidice se găsesc incluse în gel, iar pe de altă parte sunt necesare operații de încălzire, spălare, condiții în care fragmentele nucleotidice își vor pierde poziția dată de lungime. De aceea este necesar transferul și „fixarea" fragmentelor oligo- sau polinucleotidice pe un suport inert la condițiile de lucru (de regulă folii poroase de poliamidă – nylon sau de nitroceluloză).

Transferul are loc în condițiile unui mediu de tărie ionică ridicată. Realizarea practică a blottingului se face prin: capilaritate, sucționare la vid sau electromigrare.

Practic, placa cu gelul care conține fragmentele de acizi nucleici separate electroforetic se introduce într-o soluție de NaOH, care are rolul de a denatura duplexurile ADN. Apoi placa se introduce într-o cuvă care conține o soluție salină. Peste gel se așează folia poroasă de nitroceluloză sau nylon. Pe aceste folii se vor atașa doar monocatene. În cazul transferului prin capilaritate, peste placa poroasă de nitroceluloză sau poliamidă se așează mai multe straturi de hârtie absorbantă. În timp, prin capilaritate, se realizează transferul fragmentelor. În cazul electromigrării pe gel se plasează o placă electroconductoare care se leagă la anod, catodul fiind legat la soluția în care este plasată placa cu gel. Transferul se face prin deplasarea polianionilor în câmp electric până la placă. Transferul prin vacuumsucțiune se face prin conectarea plăcii poroase la o incintă vidată care realizează transferul materialului.

După uscare într-o etuvă de vid, folia cu monocatenele ADN se supune unei operații de prehibridizare, care constă în incubare cu o soluție proteică (de regulă albumină serică bovină) sau / și o soluție de detergent. Prehibridizarea are rolul de a ocupa situsurile din folie unde s-ar putea atașa fragmentele ADN din sonda nucleotidică. În continuare, folia care conține fragmentele separate se pune în contact, într-o pungă de plastic, cu soluția care conține sonda nucleotidică marcată radioactiv sau chimic. În timpul incubării, sonda nucleotidică se hibridizează cu fragmentele complementare. După incubare are loc spălarea foliei pentru îndepărtarea excesului de soluție care conține sonda. Vizuali-

zarea sondei, implicit a fragmentelor hibridizate se face prin autoradiografie, în cazul utilizării sondelor calde sau prin expunere la lampa de ultraviolete.

Tehnica a fost aplicată prima dată de către SOUTHERN. De aici si numele de SOUTHERN blotting. O variantă a acesteia este utilizată pentru hibridizarea fragmentelor ARN, în acest caz tehnica se numeşte NORTHERN. În acest caz, pentru denaturarea fragmentelor de acid ribonucleic se foloseşte formaldehida, după care are loc hibridizarea propriuzisă.

Ca tehnici de hibridizare, atât tehnica NORTHERN cât şi SOUTHERN se bazează pe complementaritatea catenelor ADN – ADN sau ARN – ADN ori mai rar ARN-ARN. Pe acest model a fost elaborată metoda WESTERN pentru determinarea unei anume proteine, prin complementaritatea legării cu un anume anticorp (care constituie sonda). Proteina este denaturată în prealabil cu SDS. Anticorpul se marchează prin ataşarea covalentă a unui colorant sau a unei enzime. După incubare, excesul se îndepărtează prin spălare, complexele antigen-anticorp formate putând fi puse în evidenţă direct, în cazul marcării prin colorare, sau indirect în cazul marcării enzimatice. În acest ultim caz, dintr-o moleculă de proteină legată de anticorp se obţin mai multe molecule de substrat transformate, care se pun în evidenţă printr-o tehnică analitică corespunzătoare.

5.3.1.7. Structura terţiară a ADN-ului

Complexitatea ADN depinde de tipul procariot sau eucariot al celulei precum şi de poziţia organismului pe scara evoluţională. Organizarea spaţială a macromolculelor de ADN în interiorul celulei definesc structura terţiară a ADN-ului.

Procariotele nu au materialul genetic separat de alte structuri, neprezentând un nucleu distinct. Virusurile şi bacteriile posedă o singură moleculă de ADN bicatenar, de regulă circular, închis covalent. De menţionat că, în cazul virusurilor, materialul genetic poate fi stocat şi sub formă de ARN.

Eucariotele posedă de regulă un nucleu distinct structural de citosol, de care este separat printr-o dublă membrană poroasă. Dimensiunile reduse ale celulei, pentru a nu mai aminti pe cele ale nucleului, obligă

ADN-ul să adopte conformații cu grad mare de împachetare[64]. Atingerea acestor conformații este posibilă doar prin interacțiunea ADN-ului cu substanțe proteice care vor ghida duplexul către conformații dense. Substanțele proteice tipice care interacționează cu ADN-ul au caracter bazic conferit de aminoacizi precum lisina, arginina, histidina și sunt cunoscute sub numele de *histone.* Pe lângă histone, ADN-ul se mai găsește asociat temporar cu o serie de *proteine nehistonice,* al căror rol acoperă o mare diversitate, legată în principal de expresia genelor, de la factorii proteici responsabili de declanșarea proteosintezei, până la enzimele care facilitează acest proces. Raportul masic între materialul genomic și proteinele asociate este aproximativ unitar. Histonele sunt proteine de cinci tipuri diferite: H1, H2A, H2B, H3 și H4. Tipurile H2A, H2B, H3 și H4 prezintă un grad foarte înaintat de conservare, structura primară deosebindu-se extrem de puțin între specii. Aceasta atestă menținerea mecanismelor de pliere a ADN-ului. De fapt, aceste patru tipuri de proteine formează un octamer, prin asocierea în perechi. Acest octamer reprezintă miezul unei structuri repetitive, ***nucleozomul.*** Acesta este format din octamerul proteic descris mai sus, în jurul căruia se înfășoară două spire de dublu helix ADN, în care intră 164 pb[65].

Înfășurarea dublului helix ADN în jurul miezului nucleozomului presupune deformarea dublei catene în zona de contact cu proteina. Energia necesară procesului de deformare este maximă în canelura mică. De aceea în zonele de pliere corespunzătore canelurii mici în contact cu nucleozomul se întâlnesc foarte frecvent perechile A - T. Stabilitatea structurii nucleozomice este ridicată, pozițiile ocupate de octamer pe catena deoxiribonucleotidică fiind fixe.

Pe lângă octamerul histonic și cele două spire de duplex ADN, nucleozomul (*Fig.5.21.*) conține ca structuri de legătură, proteina H1 precum și un număr variabil de perechi de nucleotide (0 - 100). Histona H1 posedă trei situsuri de legare prin intermediul cărora se conectează doi nucleozomi adiacenți. Astfel în zona centrală a structurii H1 se află așanumitul miez, care se atașează pe nucleozom. Celelalte două situsuri

---

[64] O celulă umană obișnuită are un diametru de 20 μm. Materialul genetic cu $3 \cdot 10^9$ pb constă din 23 de perechi de molecule bicatenare de ADN, care există sub forma de cromosomi. Lungimea medie a unui cromosom este de $3 \cdot 10^9 / 23 = 1{,}3 \cdot 10^8$ pb. La o distanță de 0,34 nm / pb în conformația B a catenei va corespunde aproximativ 5 cm per cromosom. Cei 46 de cromosomi vor avea în total, conform acestui calcul 2,30 m. Pentru ca acest material să poată intra în celulă este nevoie de reducerea cu cinci ordine de mărime a lungimii materialului genetic.

[65] Perechi de baze

sunt capetele N- respectiv C- terminale ale catenei polipeptidice. Ele interacționează cu miezurile H1 atașate nucleozomilor alăturați.

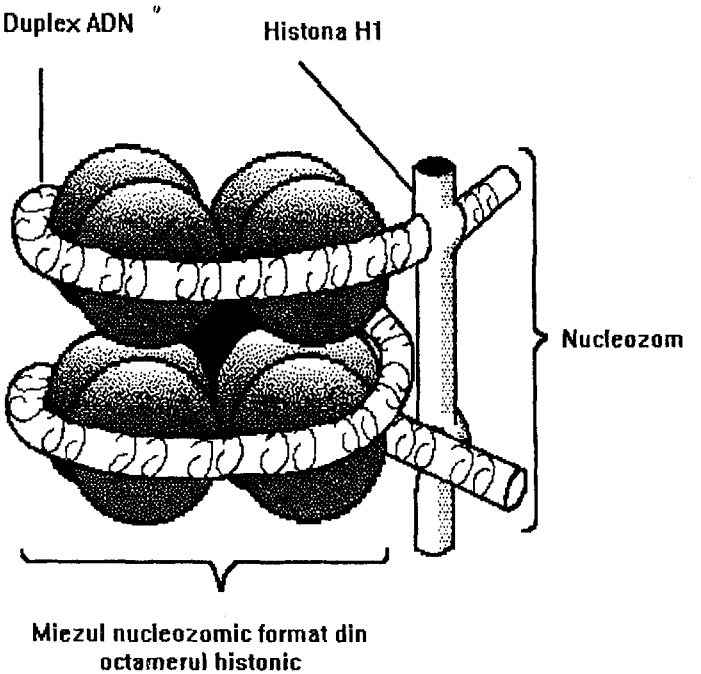


Fig. 5.21. Structura unui nucleozom izolat

O dublă catenă ADN, apare astfel ca o înșiruire de nucleozomi (care au aspectul unor mărgele pe o ață). Dublul helix care leagă doi nucleozomi adiacenți poartă numele de *ADN de legătură* (linker). Dacă dublul helix în conformație ideală (Watson-Crick) avea un diametru de 2 nm, **șirul polinucleozomic,** sau ***filamentul de cromatină,*** va avea un diametru de 11 nm, iar lungimea sa se reduce. Filamentul de cromatină nu este o structură ideală, deoarece lungimea ADN-ului linker este variabilă. De asemenea se întâlnesc porțiuni fără nucleozomi, in care există proteine de legătură nehistonice. Aceste zone sunt hipersensibile la acțiunea nucleazelor. La rândul său, șirul polinucleozomic se aranjează într-o structură superhelicoidală cunoscută sub numele de **solenoid** sau ***fibră de cromatină.*** Diametrul acestei structuri ajunge la 30 nm. Suprahelixul format conține în medie cca. șase nucleozomi pe spiră. În continuare fibrele de cromatină se vor aranja în structuri mai compacte cu aspect de ***bucle*** **(anse),** al căror diametru mediu este de cca. 300 nm. Aceste anse, la rândul lor se aranjează în structuri cu grad mai mare de

compactitate, numite ***heterocromatina***, structuri cu un diametru de cca. 700 nm, care în cursul diviziunii celulare vor atinge forma maxim condensată numită ***cromosom***. Diametrul acestei structuri de cca. 1400 nm (1,4 μm) o face bine vizibilă la microscopul optic. În alte faze ale ciclului celular decât diviziunea, aspectul microscopic al materialului genomic este difuz.

5.3.1.8. Superhelixuri. Topoizomeri și topoizomeraze

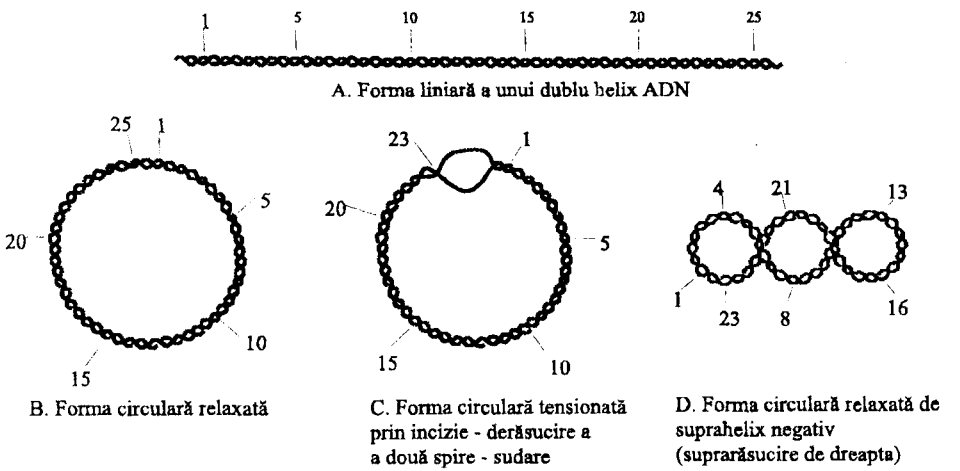


Fig.5. 22. Formarea superhelixurilor (suprarăsucirilor)

ADN-ul dublu catenar se poate prezenta și sub formă circulară inchisă, cum este cazul marii majorități, dacă nu a tuturor *cromosomilor bacterieni. Plasmidele*, care sunt purtătorii unei informații genetice secundare la bacterii, sunt tot molecule de ADN circulare. Chiar ADN-ul liniar poate fi considerat o structură cu capetele fixate, datorită asociațiilor cu proteinele. Tuturor acestor forme le este caracteristic un anumit număr de spire dependent de numărul nucleotidelor și de tipul catenelor (A, B sau Z). Acest număr de spire nu poate fi modificat decât prin incizia unei catene urmată de răsucirea sau derăsucirea acesteia și, final, de sudarea capetelor libere. Prin aceste răsuciri - derăsuciri se creează o **tensiune** în structura moleculei de ADN, care este compensată prin apariția unor **suprarăsuciri** ale întregului dublu helix, în sens opus răsucirii cauză.

Considerăm un dublu helix de 260 pb, forma B. Plecând de la valoarea medie de 10,4 nucleotide per spiră, acest dublu helix liniar ipotetic va avea în forma sa relaxată 260 / 10,4 = 25 de spire (*Fig.5.20.A*). Prin le-

garea celor patru capete (2 x 2), se va obține un dublu helix relaxat tot cu 25 de spire (*Fig.5.20.B*).

Dacă înainte de legarea capetelor două spire se vor desfășura, se obține un dublu helix circular tensionat (*Fig.5.20.C*), care va avea doar 23 de spire. La același efect se poate ajunge și plecând de la dublul helix circular prin incizia unei catene, derăsucirea a două spire, urmată de sudarea celor două capete rămase libere. Structura este tensionată, deoarece nu se mai pot stabili toate legăturile de hidrogen posibile între perechile de baze opuse, ceea ce conferă structurii un exces energetic față de forma relaxată. Această structură tensionată va trece spontan într-o structură relaxată prin supraînfășurarea dublului helix asupra sine-însuși, desigur în sens invers răsucirii care a creat tensiunea inițială (*Fig. 5.20.D*)

Cuantificarea helicității diferitelor forme ale ADN-ului circular sau liniar cu capetele fixate se face prin intermediul unor parametri topologici:

1. **Numărul de legare** („linking number" - L) desemnează *numărul de spire spre dreapta, formate de o monocatenă de ADN în jurul celei complementare, atunci când axa dublului helix este constrânsă să rămână plană.* În exemplul considerat, formele A și B au L = 25, în timp de formele C și D au L = 23. Conformerii care diferă prin valoarea lui L poartă numele de ***topoizomeri.*** Interconversia topoizomerilor se face cu ajutorul unor enzime specializate, topoizomerazele.
2. **Numărul de suprarăsuciri** („writhe number" - W) desemnează numărul de spire pe care dublul helix le execută asupra lui. Prin aceasta dublul helix nu mai poate adopta o structură plană. Semnul acestui parametru este negativ in cazul în care rotația are loc spre dreapta, deci când este cauzat de o structură tensionată plană rezultată prin derăsucire, și pozitiv în caz contrar. In exemplul considerat pentru structura D parametrul W= - 2.
3. **Numărul de răsuciri** („twist number" - T) desemnează numărul total de spire helicoidale. Tot în exemplul de mai sus, pentru conformația B: W=0, T=25; pentru conformația C: W=0, T= 23, iar pentru conformația D: W=–2, T=25.

   Intre acești parametri, după cum se observă, există o relație simplă:

$$L = T + W$$

Prin apariția suprarăsucirilor sau a suprahelixurilor, crește gradul de compactitate al ADN-ului (scade volumul ocupat), astfel încât viteza de

migrare în câmp centrifugal, respectiv în câmp electric crește. De fapt, pe baza acestei proprietăți observate de Jerome VINOGRAD, în 1963, au fost demarate cercetările asupra formelor de suprahelix ale ADN-ului.

Gradul de suprarăsucire poate fi de asemenea cuantificat prin **densitatea de suprarăsucire (σ).**

Aceasta se definește ca raport între diferența dintre numerele de legare ale formei suprarăsucite (L_k) și ale formei originare L_0, și L_0:

$$\sigma = \frac{L_k - L_0}{L_0}$$

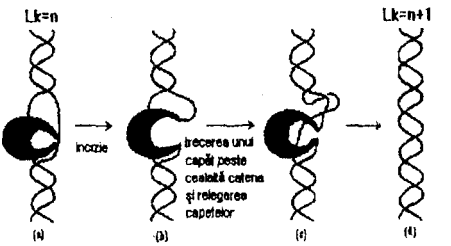


Fig.5.23. Modul de acțiune al topoizomerazelor de tip I.

În exemplul considerat valoarea sa este (23–25) / 25 = –0.08. Pentru majoritatea moleculelor de ADN naturale σ are valoarea medie de –0,06. Valoarea negativă atestă că formele suprahelicate se obțin prin despiralarea conformerilor inițiali. Suprarăsucirile negative pregătesc dublul helix ADN pentru procese care presupun separarea celor două catene: replicare, recombinare și transcriere. Suprahelixurile pozitive sunt de asemenea compacte, dar procesul de separare este mai dificil decât în cazul suprahelixului negativ.

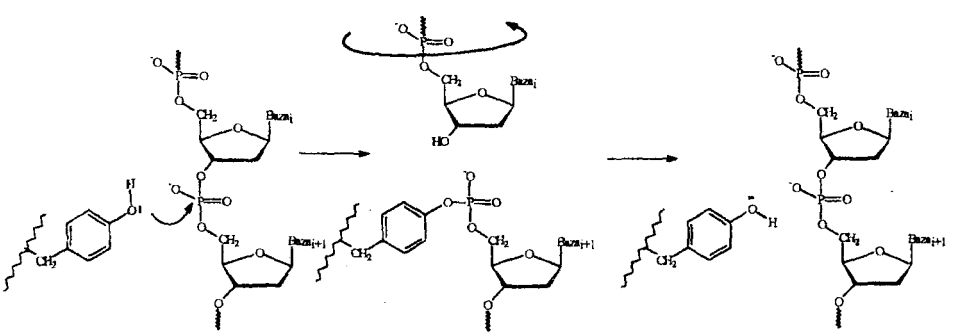


Fig. 5. 24. Mecanismul de acțiune al topoizomerazelor

Topoizomerazele sunt enzime care modifică numărul de legare, sau altfel spus, fie introduc, fie elimină suprarăsucirea duplexului ADN circular ori cu capetele fixe.

După cum ele realizează secțiunea uneia sau a ambelor catene ale dublului helix ADN, topoizomerazele sunt de tip I respectiv de tip II.

Topoizomerazele de tip I se mai numesc și enzime de relaxare, întrucât ele reduc densitatea de suprarăsucire. Ele acționează secvențial. Inițial, are loc scindarea unei legături fosfoesterice dintr-o monocatenă. Energia chimică a legăturii se conservă prin formarea unui conjugat topoizomeraza I - ADN, prin intermediul unui rest de tirosină care va participa la o reacție de transesterificare. Capătul secționat al ADN-ului liber (capătul 3'-OH), va putea suferi o rotație liberă în jurul catenei intacte, după care printr-o nouă reacție de transesterificare are loc alipirea fragmentelor de catenă și eliberarea enzimei. (*Fig.5.23* și *Fig. 5.24.*).

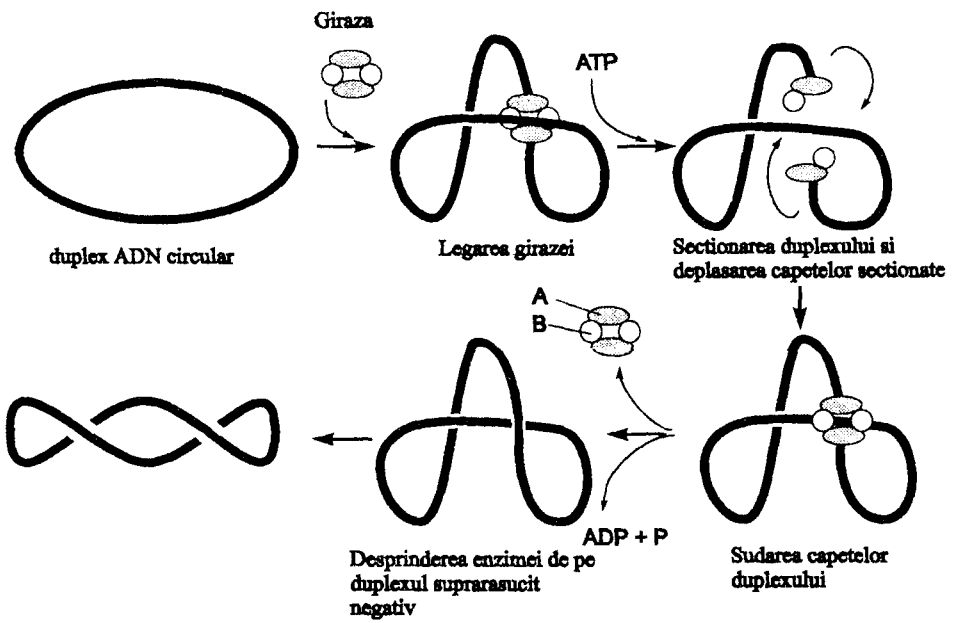


Fig.5.25. Modul de acțiune al topoizomerazelor de tip II

Topoizomerazele de tip II, secționează ambele catene ale duplexului ADN. Cele mai cunoscute sunt girazele. Ele introduc suprarăsuciri, într-un proces defavorizat energetic. De aceea acțiunea lor este cuplată cu hidroliza ATP. Introducerea unei suprarăsuciri într-un dublu helix cu $\sigma = 0{,}06$, necesită aproximativ 9 kcal·mol^{-1}. O astfel de enzimă, binecunoscută, este giraza din *E. coli*, care este un tetramer format din două

perechi de subunităţi identice. Una dintre subunităţi are masa de 105 kD, iar cealaltă de 105 kd. Interacţiunea primară dintre enzimă şi dubla catenă constă în înfăşurarea pe o porţiune de aproximativ 200 pb în jurul proteinei. In această structură, legarea ATP-ului declanşează procesul de clivare al celor două catene ADN, odată cu a tetramerului AABB în dimerii AB AB. Situsul de clivare de pe o catenă ADN, este deplasat cu patru nucleotide de cel de pe cealaltă catenă. Capetele 5'-fosfat secţionate vor fi legate de câte un rest de tirosină de pe câte o subunitate A. Această legare a ambelor capete ale secţiunii împiedică pierderea de suprahelicitate. În continuare, unul dintre capetele fixate se va deplasa printr-o mişcare de rotaţie (doar în sensul realizării unei suprarăsuciri negative), în jurul porţiunii intacte, cele două capete revenind una în apropierea celeilalte. În această conformaţie, are loc hidroliza ATP-ului legat de enzimă, care duce la reformarea legăturilor fosfodiesterice din cele două catene şi totodată refacerea structurii tetramerice a enzimei şi disocierea acesteia de pe ADN (*Fig. 5.25.*)

5.3.2. Structura secundară şi terţiară a acizilor ribonucleici (ARN)

Dacă pentru ADN, starea „normală", adică majoritară, este de dublu helix (duplex), pentru ARN, starea cea mai frecvent întâlnită este aceea de monocatenă. Excepţiile observate, apar pe porţiuni de catenă de ARN, atât intracatenar cât şi intercatenar. Catenele partenere pot fi atât ARN, cât şi ADN (hibrizii ADN-ARN joacă un rol important în hibridizarea acizilor nucleici). Zonele dublu catenare (inter- sau intra- catenare se formează tot prin împerecherea bazelor complementare A-T(U) respectiv G-C. Deoarece prezenţa hidroxilului din poziţia 2' împiedică porţiunea dublu catenară să adopte o conformaţie de tip B, în structurile de tip duplex ale ARN se întâlnesc conformaţii de tip A, cu 11 pb per spiră şi cu bazele puternic deplasate de la perpendicularitatea faţă de planul dublului helix.

S-au sistematizat trei tipuri principale de ARN, ce diferă între ele prin rolul jucat în sinteza proteică: ARN mesageri (***mARN***), ARN de transport (***tARN***) şi ARN ribozomali (***rARN***). Câteva dintre caracteristicile esenţiale ale acestora, relevate din bacteria *Escherichia coli* sunt prezentate în tabelul 5.4.

Pe lângă acestea mai există şi ARN de masă mică snRNA (***s**mall **n**uclear **r**ibonucleic **a**cids*) sau scRNA (***s**mall **c**itosolic **r**ibonucleic **a**cids*), care au rol în procesarea acizilor ribonucleici de transport.

Tabelul 5.4. Tipuri de ARN în Escherichia coli

Tip	Funcţie	Diversitate	Număr de nucleotide	Intensitate relativă de sinteză %	Conţinut relativ la total ARN celular %	Stabilitate
mARN	transportă informatia de la ADN la ribozomi	ridicată (câteva mii de tipuri)	500 - 6000	40 - 50	3	instabil perioada de injumătăţire de 1 -3 min
rARN	intră în structura ribozomilor	3 specii: 23S 16S 5S	2800 1540 120	50	90	stabil
tARN	transportă aminoacizii până la ribozom	50 - 60	75-90	3	7	stabil

5.3.2.1. ARN mesageri (mARN)

Poartă informaţia conţinută într-o secvenţă de ADN, sub forma unei secvenţe transcrise, similară celei iniţiale. Secvenţa unui mARN[66] este similară celei originale. Diferenţele între catena matriţă (ADN) şi cea copie (ARN) constau în înlocuirea deoxiribozei din ADN cu riboza în mARN şi înlocuirea timinei din ADN cu uracilul în mARN. Ulterior, mARN-ul replică, se va traduce într-o secvenţă de aminoacizi, care va forma noua catenă polipeptidică sintetizată. Această catenă polipeptidică sintetizată reprezintă expresia, sau forma exprimată a informaţiei genetice stocate în ADN (în genă).

Deşi intensitatea relativă de sinteză este mare, corespunzătoare nevoilor constante ale celulei pentru diferite proteine, conţinutul momentan de mARN este redus, durata de viaţă a acestuia fiind mult mai mică faţă de celelalte două tipuri. Aceasta se explică prin hidroliza imediată a mARN-ului după îndeplinirea rolului său, până la nucleotidele componente, care vor servi ca materie primă pentru noi procese de transcriere. Faptul că fiecărei proteine (secvenţe proteice) îi corespunde o secvenţă de mARN justifică diversitatea moleculară a acestui tip de ARN.

[66] Procesul de sinteză al unei catene de mARN după modelul unei anumite secvenţe din ADN poartă numele de **transcriere** şi va fi descris în detaliu în Vol II la capitolul de sinteza proteică.

La eucariote, mARN se sintetizează în nucleu, (transcriere), se transferă în citosol, se atașează pe ribosomi unde participă ca model (matriță) la sinteza noii catene polipepticidice în cursul procesului de traducere.

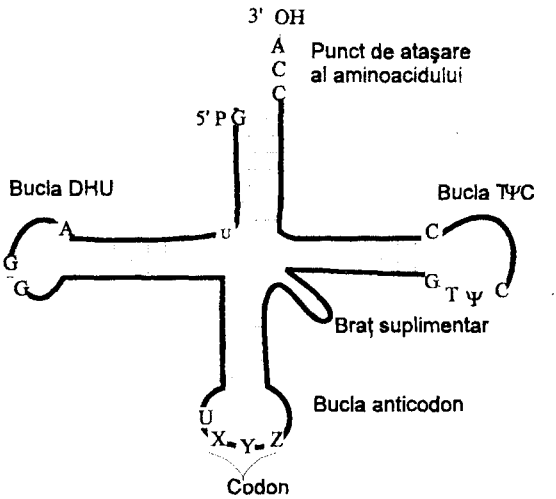


Fig.5. 26. Modelul plan al unei molecule de t-ARN

Structura mARN este monocatenară. Pot exista însă zone limitate ca lungime, în special la procariote în care apar legături intracatenare (porțiuni stereocomplemetare cu baze perechi A-U și G-C), care conferă structurii locale aspectul unei agrafe de păr (hair pin). Structura mARN-ului este dificil de explorat datorită instabilității acesteia.

5.3.2.2. ARN de transport sau de transfer (tARN)

Au rolul de a transporta aminoacizii din citosol, până la locul sintezei catenei polipeptidice, ribosomul. Aici, tot datorită tARN, aminoacizii sunt ordonați în catena polipeptidică în formare, pe baza secvenței nucleotidice din mARN care se găsește atașat de ribosom. Acesta le conferă caracteristica de moleculă adaptor între catena de mARN și catena polipetidică.

Pentru realizarea acestor procese fiecare acid ribonucleic de transfer posedă capacitatea de recunoaștere a unei anumite secvențe de nucleotide din mARN și în același timp de legare a unui anume aminoacid.

Pe lângă funcțiile de recunoaștere a secvențelor nucleotidice din mARN și de legare a aminoacizilor, tARN-ul mai îndeplinește funcția de activator al moleculei de aminoacid care va intra in reacția de policondensare. Aceasta pentru că aminoacidul va fi transportat prin legare

esterică la tARN.(pentru detalii vezi sinteza proteică). Structura tARN asigură îndeplinirea funcțiilor sale.

Față de variabilitatea mare a mARN, numărul de specii de tARN la nivel celular este limitat la cca. 40 cu variații relativ mici între specii.

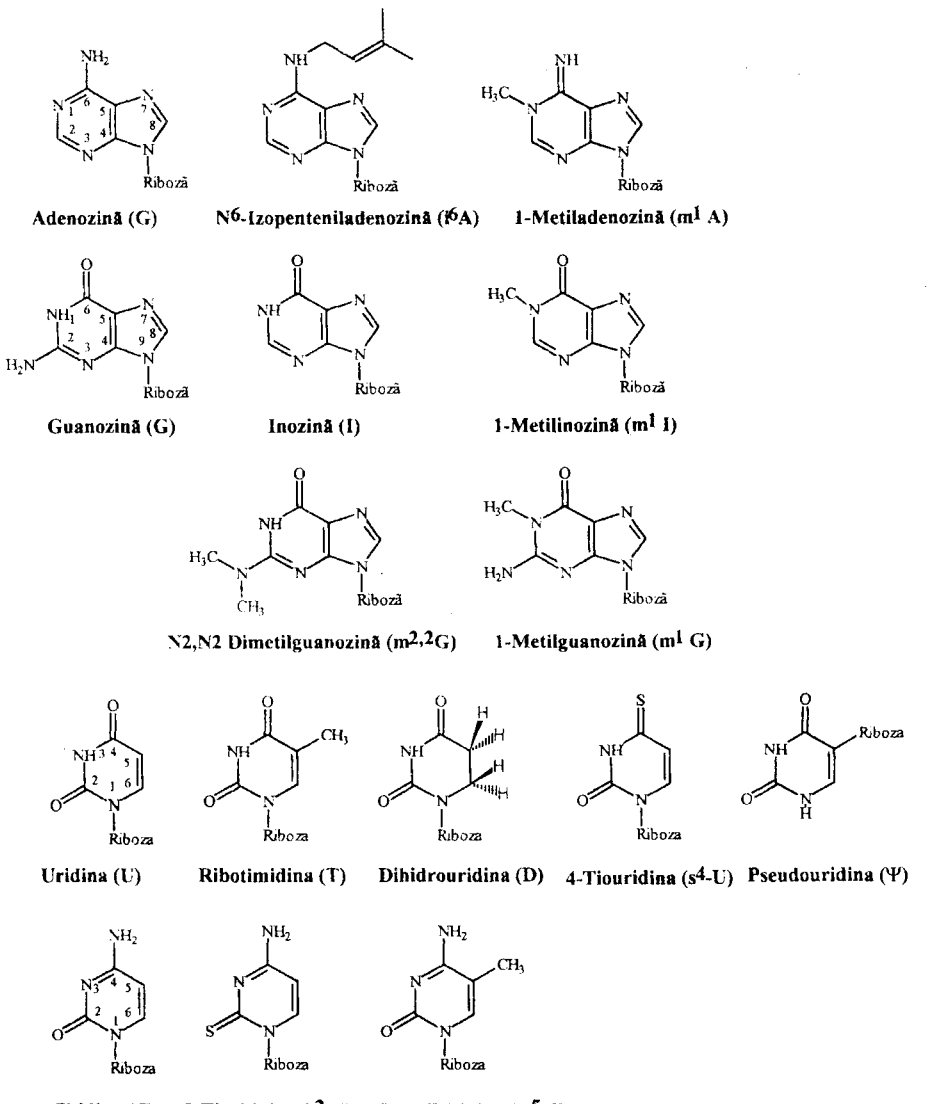


Fig. 5.27. Baze atipice întâlnite în moleculele de tARN

Moleculele de tARN posedă caracteristici comune, pe lângă aspectele particulare care le deosebesc.

Moleculele de tARN sunt formate dintr-un **număr limitat de nucleotide** (73–94). Unele dintre acestea se găsesc împerecheate.

În componența tARN se găsesc nucleotide cu **baze atipice**. Numărul lor variază de regulă între 7 și 15. Cele mai frecvent întâlnite sunt prezentate în *Fig.5.27.* Multe dintre acestea sunt derivați metilați sau dimetilați ai bazelor A, U, C și G. Bazele atipice au potențialul de formare a perechilor alterat. Mai mult, modificările sterice, electronice și mai puțin cele lipofile permit o modulare mai rafinată a interacțiunii cu proteinele ribosomale, cu sintetazele care acționează în decursul sintezei proteice.

Capătul 3'-OH terminal are întotdeauna secvența de baze CCA, iar capătul 5'-fosforilat are în majoritatea cazurilor un rest de acid guanilic. Fiecare moleculă de tARN are **patru zone dublu helicate**, care conferă un aspect de frunză de trifoi cu patru foi pentru molecula forțată să apară în plan (*Fig. 5.26.*). Structura realizată prin formarea celor patru zone de duplex delimitează **patru bucle**: *bucla TΨC*, al cărei nume derivă de la secvența obligatorie ribotimină-pseudouracil-citozină, o buclă suplimentară de lungime variabilă (*braț suplimentar*), *bucla anticodon*, care conține o secvență de trei nucleotide, XYZ, strict stereocomplementară cu o secvență corespunzătoare (codon) din mARN. Codonul este la rândul său integrat într-un motiv comun:

5'~~~~Pirimidină (facultativ metilată) - Uracil- X-Y-Z-Purină modificată-Bază variabilă~~~~3'

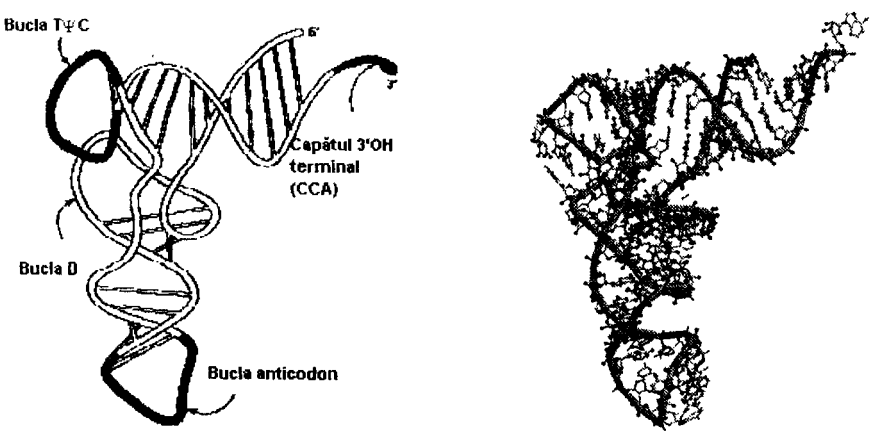


Fig.5. 28. Schema de principiu și modelul spațial al unei molecule de tARN

Ultima structură este *bucla DHU* care conține mai multe resturi de dihidrouracil în moleculă.

Structura tridimensională, (*Fig.5.28*) corespunzătoare structurii terțiare, a fost rezolvată pentru prima dată în anul 1974, prin studiile de difracție de raze X efectuate pe tARN al fenilalaninei din drojdie. Ea are forma literei L (văzută în spațiu) și rezultă prin stabilirea unor legături de hidrogen între nucleotidele din bucla D, cu cele din buclele suplimentară, respectiv din cea TΨC. Perechile de baze între care se stabilesc legăturile de hidrogen nu sunt totdeauna cele canonice (A-T și G-C).

La un capăt al „L"-ului se găsește zona de legare a aminoacidului (secvența CCA 3'OH- terminală), iar la cealaltă extremitate se găsește bucla anticodon. Între cele două zone distanța este de aproximativ 80 Å. Colțul literei este realizat de buclele D și TΨC.

5.3.2.3. ARN ribozomal (rARN)

Formează masa principală a ribozomilor. Acești sunt organite celulare situate în citoplasmă formate din acid ribonucleic (65 %) și din proteine. Studiul ribozomilor a arătat că structura acestora este formată din două subunități ribonucleoproteice asociate prin legături slabe, între care există un spațiu în care poate intra mARN-ul.

Aceste două subunități diferă între ele prin masă moleculară cuantificată prin constanta de sedimentare Svedberg.

Constanta de sedimentare S, este o mărime care se utilizează în cazul determinărilor comparative de masă molară a unor molecule prin măsurarea vitezei de deplasare a substanței într-un câmp ultracentrifugal. Ea se determină cu ajutorul expresiei:

$$S = \frac{v}{\omega^2 \cdot r} \cdot 10^{13}$$

în care v este viteza de deplasare a substanței în cm · s^{-1} în câmpul centrifugal creat la ω rotații pe secundă într-un rotor cu raza r (cm). Constanta de sedimentare va depinde direct de masa particulei, de densitatea acesteia, de formă, și invers de densitatea mediului în care are loc centrifugarea. Ea este o măsură reproductibilă pentru determinarea în aceleași condiții legate de mediul de sedimentare a masei moleculare și a formei, pentru că la aceeași masă molară constanta de sedimentare va avea valori cu atât mai mari cu cât abaterea de la forma sferică va fi mai mare. De exemplu o substanță care va avea o viteză de sedimentare de

3,4 $\cdot 10^{-5}$ cm $\cdot s^{-1}$ într-o ultracentrifugă cu turația de 75.000 rot/min va avea constanta de sedimentare:

$$S = \frac{3{,}4 \cdot 10^{-5}}{\left(\frac{75.000}{60}\right)^2 \cdot 8} \cdot 10^{13} = 27S$$

Cu titlu informativ, în cazul bacilului *Escherichia coli*, un ribozom (70 S) este format din două subunități (50 S și 30 S). Datorită deosebirilor de formă între aceste subunități constanta de sedimentare a ribozomului nu este aditivă.

Subunitatea mică (S) este formată dintr-un rARN (16S) care conține 1542 nucleotide și 21 de r-proteine diferite, notate S1 - S21. (S de la small). Acest ansamblu are masa de cca. 900.000 daltoni.

Subunitatea mare (L - de la large), este formată din două catene rARN (5S cu 120 de nucleotide și 23S cu 2904 nucleotide) și 34 de r-proteine dintre care patru identice.

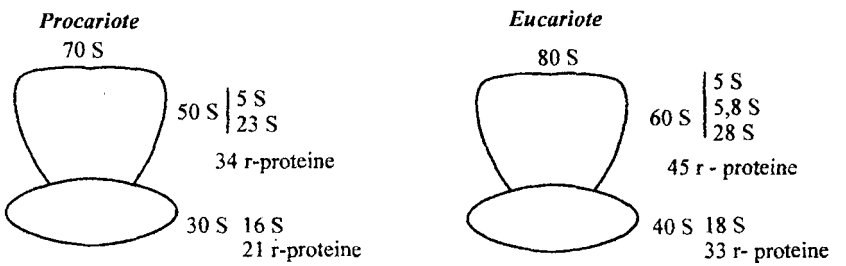


Fig.5. 29. Compoziția rARN la pro- și eucariote

5.3.2.4. Acizi ribonucleici de masă mică (snRNA)

La eucariote, în urma procesului de transcriere apare un ARN primar care conține secvențe informaționale numite **exoni** care se vor exprima în proteine precum și secvențe intercalate, numite **introni**. Acest mARN primar va suferi un proces de excizie – splicing (vezi Vol II), în urma căruia intronii vor fi excizați (îndepărtați prin secțiuni la ambele capete) iar capetele libere ale exonilor se vor suda. La acest proces participă o serie de structuri ribonucleoproteice, numite snurps (small ribonucleoprotein particles), în constituția cărora intră catene scurte, cu până la 300 de nucleotide, foarte bogate în acid uridilic. Aceste componente ribonucleoproteice au rolul de a cataliza procesul, identificând și apropiind punctele de secțiune și de sudare, iar pe de altă parte, realizând procesul de hidroliză propriuzis.

5.4. Hidroliza acizilor nucleici

5.4.1. Hidroliza acidă şi bazică a acizilor nucleici

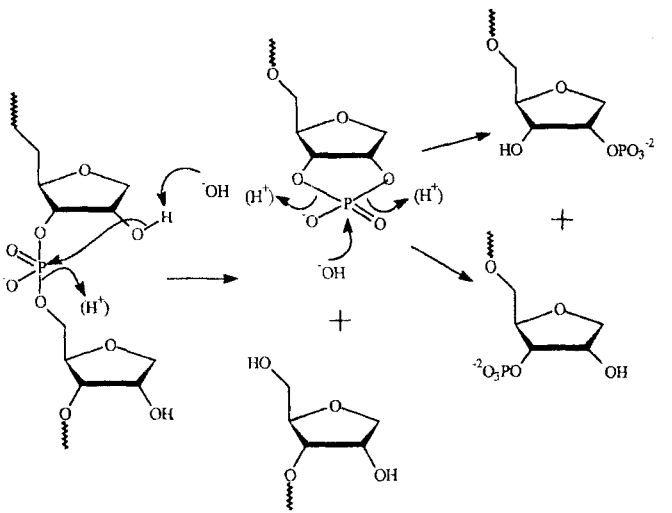


Fig.5. 30. Hidroliza ARN în cataliză bazică generală

Acizii şi bazele pot afecta legătura N- glicozidică respectiv legătura fosfodiesterică din acizii nucleici. Datorită asimetriei legăturii fosfodiesterice, la scindarea hidrolitică a unei legături fosfodiesterice pot rezulta două tipuri de capete: capetele 3' OH terminale, notate prin convenţie cu a şi capete 5' OH terminale, notate cu b. Cu alte cuvinte, în funcţie de legătura fosfoesterică hidrolizată, se vor obţine capete 5' fosfat, în cazul a, respectiv capete 3'-fosfat în cazul b.

ARN-ul, datorită prezenţei hidroxilului din poziţia 2', este sensibil la acţiunea hidroxizilor. Ionul hidroxil acţionează asupra hidrogenului hidroxilic din poziţia 2', mărind nucleofilicitatea atomului de oxigen[67] care va ataca atomul de fosfor, cu ruperea legăturii b şi formarea unui diester ciclic. Acest ester va fi hidrolizat cu ruperea fie a legăturii cu oxigenul legat de poziţia 2' fie legăturii cu oxigenul legat de poziţia 3', rezultând final un amestec de nucleozid 2' şi 3' fosfaţi (*Fig.5.30*). ARN-ul este stabil la acţiunea acizilor diluaţi, in timp ce ADN-ul chiar în prezenţă de HCl 1mM, va suferi reacţii de depurinare, ca rezultat al clivării legăturilor N-glicozidice ale guaninei respectiv adeninei. Această

[67] Acest exemplu ilustrează mecanismul de cataliză bazică generală (vezi capitolul 4)

depurinare are loc datorită bazicității mai pronunțate a purinelor decât a pirimidinelor. Prin protonarea nucleului purinic se creează un centru încărcat pozitiv care atrage electronii legăturii N- glicozidice sfârșind prin a o rupe. Acest efect nu este observat la ARN, deoarece prin protonarea hidroxilului 2' se echilibrează efectul atrăgător al bazelor protonate. Cunoașterea acestor proprietăți este deosebit de utilă în operațiile de manipulare ale acizilor nucleici, atât prin precauțiile de pH care trebuie luate pentru a evita hidrolizele nedorite, cât și pentru descompunerea ARN nedorit într-o probă care mai conține ADN.

5.4.2. Hidroliza enzimatică a acizilor nucleici

Enzimele care hidrolizează acizii nucleici sunt numite **nucleaze**. Ele fac parte din clasa fosfodiesterazelor, reacția catalizată fiind aceea de hidroliză a legăturii fosfodiester dintre două nucleotide adiacente. De asemenea, după poziția nucleotidelor la care are loc scindarea distingem **exonucleaze**, când se formează o nucleotidă, (excizia unei nucleotide terminale), respectiv **endonucleaze** când are loc scindarea unei legături în mijlocul catenei, rezultând un amestec de oligonucleotide. Important de reținut că exonucleazele pot scinda fie legături de tip a, (acționând la capătul 3' terminal) fie realizează hidroliza legăturilor de tip b la capătul 5' al catenei polinucleotidice.

5.4.2.1. Specificitatea nucleazelor

Preferința nucleazelor față de ADN este caracteristică **ADN-azelor**, in timp ce pentru ARN este caracteristică **ARN-azelor**. Dacă această preferință nu există enzimele sunt numite pur și simplu **nucleaze**. Nucleazele pot manifesta preferință pentru o secvență nucleotidică dintr-un acid monocatenar, sau bicatenar, fiind notate cu prefixele **ss** respectiv **ds** (de la *single strand* și *double strand*).

De asemenea preferința nucleazelor se poate manifesta pentru o anumită bază azotată sau pentru anumite secvențe de patru până la opt baze, ca în cazul **enzimelor de restricție**.

Exonucleazele pot realiza secvențial depolicondensarea acizilor nucleici. Cele mai utilizate exonucleaze utilizate în practica de laborator sunt *fosfodiesteraza din veninul de șarpe* care este o „a" exonucleză ce formează 5'-nucleotide și *fosfodiesteraza din splina bovină* care este o „b" exonucleză formând 3'-nucleotide. Ambele pot cliva atât ADN cât și ARN, de unde denumirea generică de fosfodiesteraze (nucleaze). Cele două enzime au o acțiune complementară.

Nucleazele sunt instrumente de lucru pentru disecția și manipularea „in vitro" și „in vivo" a acizilor nucleici. În *Tab.5.4.* se prezintă câteva din nucleazele cele mai comun utilizate.

Tab.5.4. Nucleaze utilizate frecvent în practica de laborator

Enzime	Tip de acid nucleic	Tip de legătură scindată	Specificitate față de baze
Exonucleaze			
Fosfodiesteraza din veninul de șarpe	ADN, ARN	a	începe de la capătul 3' terminal formând 5'-nucleotide
Fosfodiesteraza din splina bovină	ADN, ARN	b	începe de la capătul 5' terminal formând 3'-nucleotide
Endonucleaze			
ARN-aza A (pancreas)	ARN	b	3'-PO_4 pirimidină
ARN-aza din *Bacillus subtilis*	ARN	b	3'-PO_4 purină
ARN-aza T_1	ARN	b	3'-PO_4 guanină
ARN-aza T_2	ARN	b	3'-PO_4 adenină
ADN-aza I (pancreas)	ADN	a	Clivează între pirimidine și purine, secționează dsADN, formând capete 3'OH libere
ADN-aza II (splină, timus, *Staphilococus aureus*)	ADN	b	oligoproduși
Nucleaza S1	ADN, ARN	a	clivează doar ssADN, ssARN

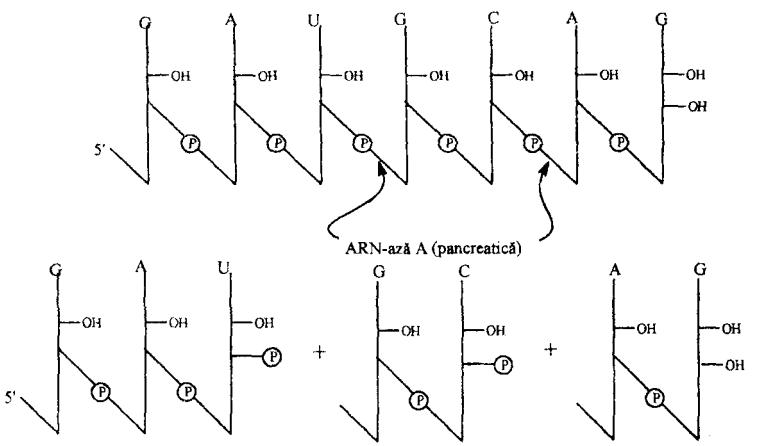


Fig.5. 31.

ARN-azele sunt mult utilizate în laborator, cea mai cunoscută fiind ARN-aza A din pancreasul bovin, o enzimă de tip „b" care clivează legăturile fosfodiesterice de lângă bazele pirimidinice (*Fig.5.31*). O particularitate a acestei enzime este termostabilitatea deosebită, care o face să reziste chiar la temperaturi de 100°C, fără să-și piardă activtatea. ARN-aza din *Bacillus subtilis* are o specificitate asemănătoare, diferența fiind că ea clivează legăturile fosfodiester de lângă bazele purinice.

ARN-azele sunt răspândite în toate materialele biologice. Aceasta creează dificultăți în izolarea ARN-ului intact. Extrem de sensibil la acțiunea ARN-azelor pare că este mARN, de aceea sunt necesare precauții deosebite.

ADN-azele hidrolizează acizii deoxiribonucleici. Dintre acestea *ADN-aza tip I* izolată din pancreasul bovin și *ADN-aza tip II* provenind dintr-o mare variatate de surse precum splină, timus sau din bacteria *Staphylococus aureus* sunt cele mai comun cunoscute și utilizate. ADN-aza tip I este o endonuclează de tip „a" care formează capete 3'-OH libere între purine și pirimidine. În concentrații mici este utilizată pentru a introduce semisecțiuni aleatoare, cu capete 3'-OH terminale în dublul helix al materialului genetic. Acesta este un precursor important în obținerea ADN-ului marcat radioactiv necesar în secvențierea ADN-ului sau pentru alte scopuri analitice. ADN-aza de tip II este o endonuclează de tip „b" care formează amestecuri de oligonucleotide cu capete 3'-PO_4 terminale.

Enzimele de restricție sunt endonucleaze izolate în special din bacterii, secționează dublul helix pe ambele catene. Temenul de *'enzime de restricție'* este în legătură cu funcția protectoare exercitată în celula procariotă, aceea de a cliva ADN-ul străin pătruns în celulă, în porțiuni mici, inofensive. Activitatea enzimelor de restricție poate fi mai complexă decât a celorlalte nucleaze, prin asocierea la funcția hidrolitică și a unor funcții de metilare specifică a ADN-ului. Multe dintre enzimele de restricție necesită asistența energetică a ATP-ului. În funcție de aceste caracteristici enzimele de restricție se sistematizează în trei categorii:

Tip I: necesită asistența ATP, dar clivează dublul helix aleator; de asemenea realizează modificări ale catenei ADN prin intermediul reacțiilor de metilare.

Tip II: nu necesită asistența ATP, nu modifică prin metilare ADN-ul dar recunosc și scindează ADN-ul la secvențe precise de 4–6 sau 8 deoxiribonucleotide.

Tip III, se deosebesc de tipul I prin recunoașterea secvenței de legare.

Cele mai utile în practica laboratorului de biologie celulară sunt enzimele de tip II. Aceasta datorită extraordinarei specificități, lipsei de modificare a produsului de hidroliză și relativei ușurințe în separare și purificare, ceea ce le face disponibile comercial.

Enzimele de restricție, cu foarte puține excepții, sunt de tip „a", producând capete 3'-OH libere.

5'~~~G-A-A-T-T-C~~~3'

3'~~~C-T-T-A-A-G~~~5'

Fig.5.32.

Secvența recunoscută, specifică pentru fiecare tip particular de enzimă de restricție are pe ambele catene o structură *palindromică*[68]. De exemplu enzima de restricție din Escherichia coli, cunoscută sub numele de cod *Eco*RI, recunoaște secvență hexanucleotidică prezentată în *Fig.5.32.*:

De remarcat faptul că secvența celor două porțiuni este identică atunci când citirea se face în același sens pe ambele catene 5'–3' sau 3'–5'. Acest tip de structură posedă o axă de simtrie de ordinul II.Scindarea aceste secvențe se face pe ambele catene între G și A (*Fig.5.33*):

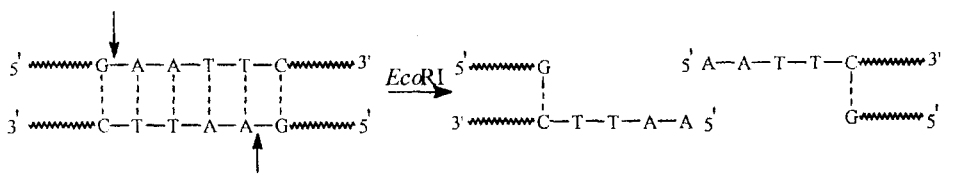


Fig.5. 33. Modul de acțiune al enzimei EcoRI

Extremitățile 5' sunt proeminente, păstrându-și complementaritatea atât între ele, dar și față de alte fragmente generate în urma acțiunii aceleiași enzime. Datorită acestei complementarității extremităților ele se numesc ***extremități sau capete 5'-adezive.***

Alte enzime de restricție, precum *Pst*I care recunoaște secvența 5'-CTGCAC–3' și clivează între A și G produce ***extremități 3'- adezive.*** Atunci când acțiunea enzimelor de restricție se face în centrul axei de simetrie de ordinul 2, precum în cazul enzimei *Bal*I,atunci nu se vor genera capete adezive, bazele complementare compensîndu-se reciproc,

[68] Un palindrom reprezintă o construcție lexicală care are același sens atunci când este citit atât de la dreapta spre stânga cît și de la stânga spre dreapta. De exemplu construcțiile „radar", „ana", „tribună nu birt", „ele fac cafele", „Madam in Eden I'm Adam" sunt palindroame.

realizându-se în acest mod secționarea dublului helix perpendicular pe axa acestuia.

În *Tab. 5.5* sunt listate câteva dintre cele mai comune enzime de restricție dintre cele peste 1000 caracterizate. Denumirea enzimelor de restricție se face printr-o grupă de trei litere din care prima este caracteristică genului organismului de origine, următoarele două sunt prescurtări ale numelui speciilor particulare. Deoarece un anume microorganism poate poseda mai multe enzime de restricție acestea de codifică prin ultimele simboluri. De exemplu *Eco*RI semnifică prima enzimă de restricție izolată din Escherichia coli, tulpina R.

Tab. 5.5. Enzime de restricție curent utilizate în laborator

Enzima	Izoschizomerii[69]	Secvența recunoscută	Capete coezive compatibile cu:
*Alu*I		AG↓CT	fără capete adezive
*Aos*I		TGC↓GCA	fără capete adezive
*Apy*I	*Atu*I, *Eco*RII	CC↓WGC	
*Asu*I		G↓GNCC	
*Asu*II	/	TT↓CGAA	*Cla*I, *Hpa*II, *Taq*I
*Ava*I		G↓YCGRG	*Sal*I, *Xho*I, *Xma*I
*Ava*II		G↓GWCC	*Sau*96I
*Avr*II		C↓CTAGG	
*Baf*I		TGG↓CCA	fără capete adezive
*Bam*HI		G↓GATTC	*Bcl*I, *Bgl*II, *Mbo*I, *Sau*3A, *Xho*II
*Bcl*I		T↓GATCA	BamHI, *Bgl*II, *Mbo*I, *Sau*3A, *Xho*II
*Bgl*II		A↓GATCT	BamHI, *Bcl*I, *Mbo*I, *Sau*3A, *Xho*II
*Bst*EII		G↓GTNACC	
*Bst*NI		CC↓WGG	
*Bst*XI		CCANNNNN↓NTGG	
*Cla*I		AT↓CGAT	*Acc*I, *Acy*I, *Asy*II, *Hpa*II, *Taq*I
*Dde*I		C↓TNAG	
*Eco*RI		G↓ATTC	
*Eco*RII	*Atu*I, *Apy*I	↓CCWGG	
*Fnu*4HI		GC↓NGC	
*Fnu*DII	*Tha*I	CG↓CG	fără capete adezive
*Hae*I		WGG↓CCW	fără capete adezive
*Hae*II		RGCGC↓Y	
*Hae*III		GG↓CC	fără capete adezive
*Hha*I	*Cfo*I	GCG↓C	
*Hind*II		GTY↓RAC	fără capete adezive
*Hind*III		A↓AGCTT	

[69] **izoschizomerii** sunt enzime care recunosc aceleași secvențe și clivează în aceleași poziții. Specificitatea poate diferi prin extinderea lungimii secvenței recunoscute. De exemplu *Mbo*I și *Sau*3A, recunosc aceeși secvență 5'-GATC–3', pe care o scindează la capătul 5' al acidului guanilic, ambele fiind de asemenea schizomeri cu *Bam*HI care are o specificitate mai mare, recunoscând secvența GGATCC, care o include pe prima. Prin clivare rezultă capete adezive complementare cu ale schizomerilor antemenționați.

Enzima	Izoschizomeri[69]	Secvența recunoscută	Capete coezive compatibile cu:
Hinfl		G↓ANTC	
Hpal		GTT↓AAC	fără capete adezive
HpaII		C↓CGG	*AccI, AcyI, AsyII, HpaII, TaqI*
KpnI		GGTAC↓C	BamHI, *BglII, MboI, Sau3A, XhoII*
MboI	*Sau3A*	↓GATC	
MspI		C↓CGG	
MstI		TGC↓GCA	fără capete adezive
NotI		GC↓GGCCGC	
PstI		CTGCA↓G	
PruII		CAG↓CTG	fără capete adezive
RsaI		GT↓AC	fără capete adezive
SacI	*SstI*	GAGCT↓C	
SacII		CCGC↓GG	
SalI		G↓TCGAC	*AvaI, XhoI*
Sau3A		↓GATC	*BamHI, BglII, MboI, Sau3A, XhoII*
Sau96I		G↓GNCC	
SfiI		GGCCNNNN↓NGGCC	
SmaI	*XmaI*	CCC↓GGG	fără capete adezive
SphI		GCATG↓C	
SstI		GAGCT↓GG	
TaqI		T↓CGA	*AccI, AcyI, AsyII, HpaII, TaqI*
ThaI	*FnuDII*	CG↓CG	fără capete adezive
XbaI		T↓CTAGA	
XhoI		C↓TCGAG	*AvaI, XhoI*
XhoII		W↓GATCW	*BamHI, BglII, MboI, Sau3A, XhoII*
XmaI	*SmaI*	C↓CCGGG	*AvaI*
XmaIII		C↓GGCCG	
XorII		CGATC↓G	

5.5. Determinarea structurii primare a acizilor nucleici

Stabilirea structurii primare a unui acid nucleic este o problemă mai complicată decât în cazul unei catene polipeptidice. Pe lângă importanța cognitivă pură a structurii primare, aceasta devine indispensabilă în tehnicile de manipulare a materialului genetic.

Principial există două metode: **metoda enzimatică** a lui Fred SANGER și **metoda chimică** dezvoltată de Walter GILBERT și Alan MAXAM. Ambele metode operează cu cantități extrem de reduse de ADN (de ordinul nanogrameleor) astfel încât tehnicile analitice de separare și detecție trebuie să asigure fidelitatea controlului procesului.

I. ***Metoda enzimatică*** mai este cunoscută și sub numele de metoda terminării premature a catenei sau metoda dideoxi.

Principiul acesteia este obținerea prin mecanisme de replicare a unor monocatene scurte de ADN, marcate radioactiv cu ^{32}P, care se termină prin 2',3'-dideoxinucleotide. Aceste fragmente sunt separate

electroforetic, scanate şi pe baza interpretării hărţii oligonucleotidice se determină structura fragmentului nou sintetizat, identic în acelaşi sens cu fragmentul original.

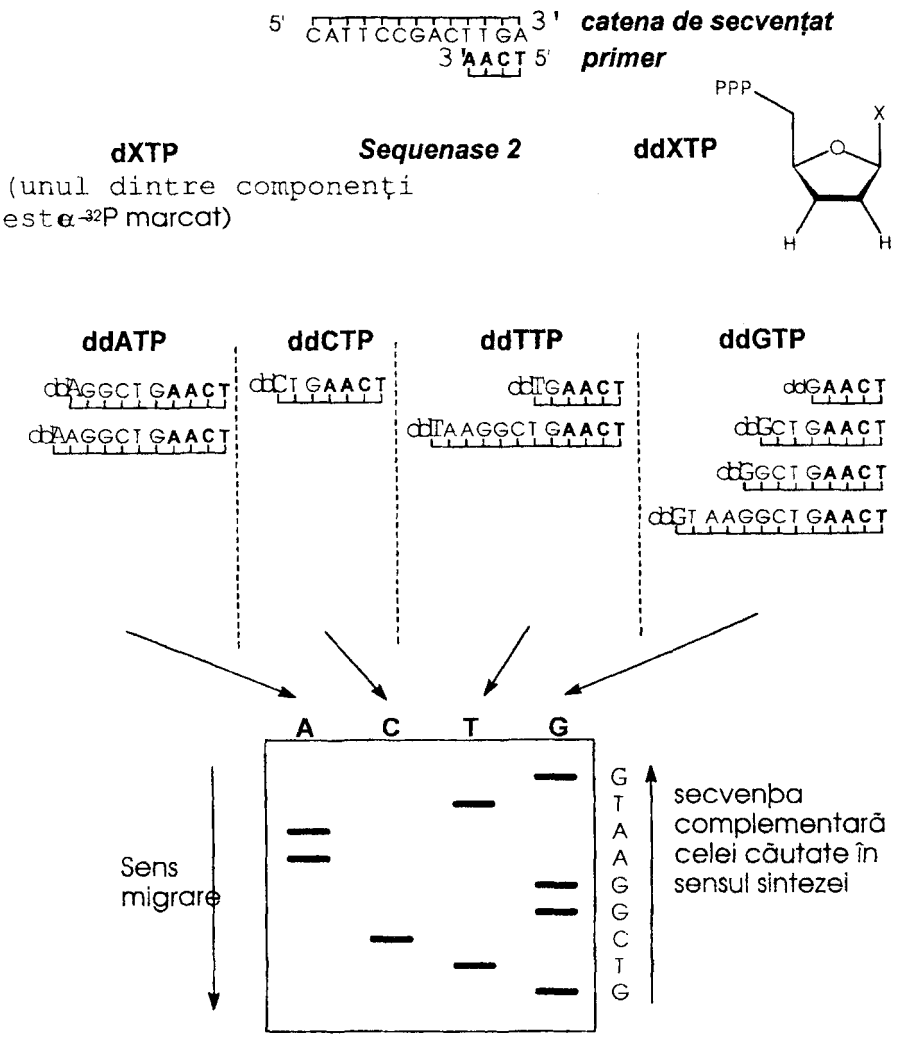


Fig.5. 34. Metoda enzimatică (SANGER) de secvenţare a catenelor ADN

Concret, are loc în cadrul a patru experimente paralele policondensarea unui amestec de **nucleozid trifosfaţi** (XTP), dintre care unul este **marcat radioactiv**, pentru vizualizarea finală a fragmentelor. Fiecare mediu va conţine câte un tip de **2',3' dideoxinucleotidă**. Aceasta, neposedând grupare 3'-OH terminală, va putea fi înglobată aleator în secvenţa nou sintetizată, doar ca ultimă componentă, deoarece sinteza

noii catene făcându-se în sensul 5' → 3' următoarea nucleotidă nu se mai poate lega (neavând la ce). Policondensarea se realizează cu o ADN polimerază special destinată acestui scop **SEQUENASE2®**, care este în fapt ADN polimeraza din bacteriofagul T7, modificată prin tehnici de inginerie genetică prin inactivarea activităților exonucleazice. Ca orice ADN polimerază, această enzimă necesită un **primer**, care se adaugă inițial. Metoda folosește drept primer o secvență oligodeoxiribonucleotidică.

Concentrația 2',3' dideoxinucleotidelor este aleasă astfel încât frecvența introducerii acestei molecule să nu fie prea mare, respectiv această substanță să poată fi intercalată în orice poziție corespunzătoare. Dacă valoarea concentrației ar fi prea mare catenele sintetizate ar fi prea scurte, iar dacă concentrația ar fi prea mică ar exista riscul neîncorporării și deci al imposibilității stopării reacției.

După sinteză, amestecul de fragmentele din fiecare experiment sunt supuse electroforezei pe aceeași placă, dar conținutul fiecărui experiment va fi plasat în zone diferite. In funcție de mobilitatea electroforetică dependentă de mărimea fiecărui fragment are loc distribuirea benzilor pe suprafața gelului.

Citirea electroforegramei se face prin autoradiografie, utilizând proprietatea fosforului marcat de a impresiona o placă fotosensibilă. Marcând atât pe linia de start cât și pe verticală (în funcție de lungimea fragmentului) tipul dideoxinucleotidelor utilizate, citind electroforegrama în sensul scăderii mobilității electroforetice, vom avea secvența primară a catenei complemetare celei supuse analizei (în sensul 5' → 3', evident mai puțin primerul). Schematic, mersul secvențării este prezentat în *Fig. 5.34.*

O variantă a metodei SANGER utilizează cu bune rezultate **arabinoza**, care este epimerul C–2' al ribozei, care se bucură de aceleași proprietăți ca și dideoxiriboza.

Prin utilizarea unor primeri marcați, prin atașarea covalentă de *compuși fluorescenți* **metoda de secvențare a putut fi automatizată.** La o operațiune de secvențare se lucrează cu patru tipuri de primeri, care diferă prin colorantul atașat covalent. Fiecare tip de primer va fi asociat cu dideoxinucleozidtrifosfatul corespunzător. După ce procesul de sinteză a fost terminat în fiecare din cele patru experimente paralele, probele se combină și se supun electroforezei. Electroforegrama este scanată ulterior cu un fascicol laser, care excitând fiecare colorant îi va provoca fluorescența într-o regiune particulară a spectrului. Radiația

emisă, va fi captată de către o unitate de detecție rezultatul fiind interpretat de către un software specializat. Secvența obținută citită de la coadă la cap (în ordinea creșterii mobilității electroforetice sau scăderii masei fragmentelor) este secvența complemetară celei căutate. Viteza de lucru a unui secvențor automat este de cca. 10000 baze / zi.

II. ***Metoda chimică*** utilizează tot un ADN monocatenar, marcat la un capăt[70] (cel mai adesea 5'-) cu fosfor radioactiv. Catena este apoi scindată aleatoriu, dar în puncte pentru care reactivii utilizați prezintă regioselectivitate. Sunt disponibile reacții specifice pentru guanină și reacții specifice pentru bazele purinice. Prin diferență se poate stabili poziția resturilor de adenină. De asemenea este disponibilă o reacție pentru pirimidine (C + T) care, condusă în condiții particulare, devine regiospecifică pentru citozină. Și în acest caz, prin diferență se poate atribui poziția timinei.

II.1. Clivarea la nivelul acidului guanilic, (*Fig. 5.35.*) se realizează prin tratarea catenei cu dimetilsulfat. Acesta metilează N7 din structura guaninei, creând o sarcină pozitivă extinsă. În prezența ionilor HO^- și a piperidinei are loc scindarea legăturii 8–9 din nucleul purinic cu formarea unei grupări carbonil și ulterior desfacerea legăturii N-glicozidice precum și a celei semiacetalice, distrugând complet nucleotida inițială. Îndepărtarea resturilor se face prin două reacții de β-eliminare, realizate datorită ionului HO^-. În acest mod se vor obține două fragmente, care vor poseda fiecare câte o grupare fosfat la locul îndepărtării restului de acid guanilic (3' - fosfat și 5' fosfat).

II. 2. Clivarea simultană la nivelul acidului adenilic și guanilic se realizează prin tratamentul slab acid al fragmentului de ADN. În aceste condiții are loc depurinarea. Distrugerea restului de riboză are loc la pH = 2 în prezență de piperidină și ulterior de HO^-.

[70] marcarea se realizează pe fragmentul initial de ADN, dublu catenar, prin utilizarea unei polinucleotidkinaze dintr-un fag, și ATP, la care ultimul fosfor, (cel neadiacent nucleotidei) este 32P. Enzima transferă doar ultimul rest fosfat pe ambele capete 5'-terminale ale nucleotidei.

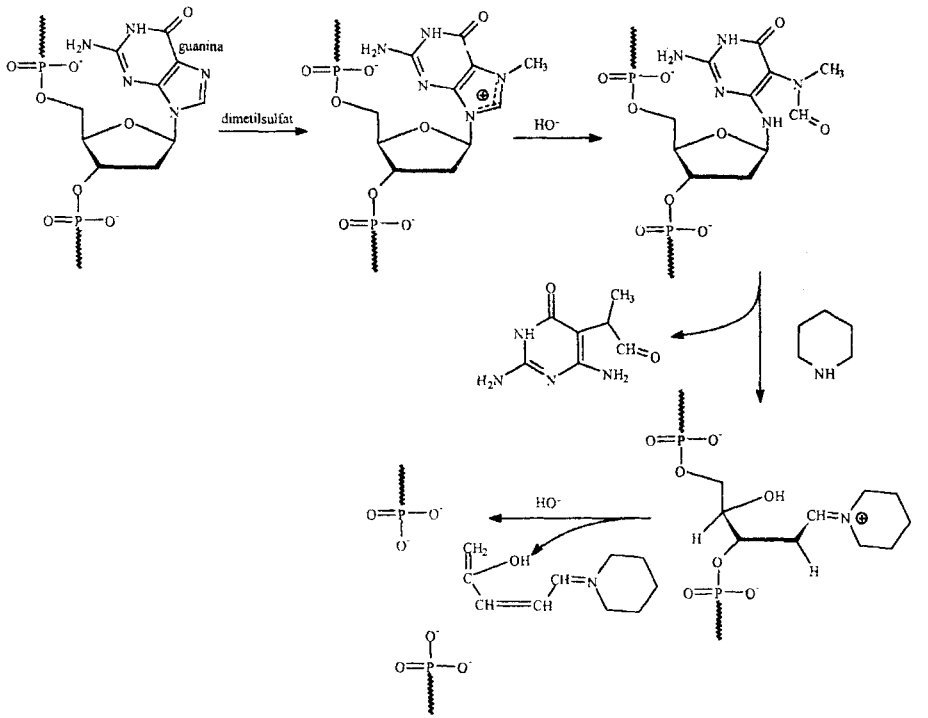


Fig.5.35. Clivarea catenei ADN la nivelul resturilor de acid guanilic

II. 3. Clivarea simultană a bazelor pirimidinice (*Fig.5.36.*) se bazează pe utilizarea hidrazinei ca reactiv cu regiospecificitate corespunzătoare. Acest reactiv, printr-o adiție de tip Michael, urmată de o substituție (adiție eliminare), va favoriza acțiunea piperidinei, care, precum în exemplul anterior, va exciza fragmentul glucidic modificat:

II.4.Clivarea regiospecifică, prin hidrazinoliza acidului citidilic.

Dacă reacția anterioară se realizează în prezență de NaCl 2M, are loc protejarea timinei de acțiunea hidrazinei, și prin urmare atacul se va realiza doar asupra acidului citidilic care va fi excizat în totalitate, lăsând ca și în cazurile precedente libere cele două capete fosfatate.

Întocmai ca în cazul secvențării enzimatice se lucrează cu patru experimente diferite. În fiecare experiment, concentrația reactanților se stabilește astfel încât să se realizeze un clivaj per moleculă de ADN. Deoarece în fiecare experiment, există însă inițial mai multe molecule identice de ADN, după contactul cu reactivii de clivare, „masa de reacție" va conține un amestec de fragmente de lungimi diferite. Amestecul rezultat din fiecare experiment va conține întreaga serie omoloagă de fragmente diferența dintre doi compuși omologi fiind de o nucleotidă.

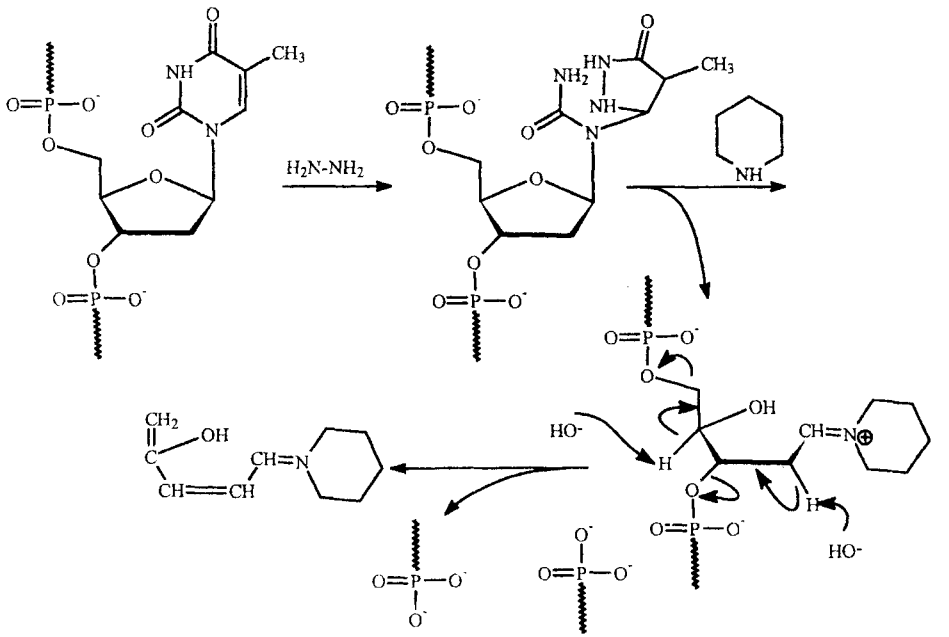


Fig.5.36. Clivarea la nivelul bazelor pirimidinice

Acest amestec poate fi separat prin electroforeză. Tot ca și în cazul secvențării prin metoda lui SANGER, pe aceeași placă de electroforeză vor fi depuse separat amestecurile de fragmente rezultate de la fiecare experiment. Vizualizarea se va face tot prin autoradiografiere. Pe autoradiografie vor fi văzute doar fragmentele care păstrează restul marcat (dacă este marcat capătul 5' terminal, vor fi vizualizate doar fragmentele care conțin capătul 5' terminal și reciproc. Evident fragmentele nemarcate vor fi invizibile).

Un aspect interesant este că baza care se citește pe placa autoradiografică nu este prezentă, ea fiind excizată. Astfel fragmentul cel mai mic va conține o bază neidentificată.

5.6. Sinteza pe suport solid a oligonucleotidelor

Obținerea de fragmente oligonucleotidice prin sinteză a devenit o necesitate odată cu dezvoltarea tehnicilor de amplificare prin polimerizare în lanț, cu necesitatea obținerii sondelor oligonucleotidice marcate, sau pur și simplu pentru scopuri investigaționale legate de structură.

Dacă sinteza MERRIFIELD a fost un model de strategie sintetică, adoptat în cazul nucleotidelor, dificultățile concrete cauzate de reacti-

vitatea mai mare a reactivilor nucleotidici folosiți, au făcut necesare adoptarea unor modalități concrete de sinteză. Principial sunt necesare măsuri de blocare a grupelor reactive, de formare a legăturilor fosfodiesterice de joncțiune dintre nucleotide, de deblocare a grupării care urmează a participa la formarea noii legături, iar final, îndepărtarea tuturor grupărilor de blocare.

În prezent se lucrează, ca și în cazul catenelor oligopeptidice, pe „automate de sinteză" de gene capabile să realizeze catene cu până la 150 de nucleotide.

Din mai multe variante, prezentăm varianta fosforamiditică care este una dintre cele mai utilizate.

Schema de sinteză prezentată în *Fig. 4.* Are următoarele particularități:

- Sensul de sinteză este 3' – 5' (opus sensului biosintetic)
- Prima deoxiribonucleotidă se află atașată de un suport inert, insolubil, de regulă sticlă cu pori controlați.
- Bazele azotate ale tuturor nucleotidelor sunt protejate la grupările amino prin benzoilare, în cazul adeninei și al citozinei, și prin izobutirilare în cazul guaninei.
- Gruparea 5'-OH se protejează prin tritilare cu clorură de dimetoxitritil.

Reacția are cinci etape:

1. Detritilarea capătului 5' terminal al nucleotidei situată pe suportul solid. Aceasta se realizează cu acid tricloroactic.
2. Reacția de cuplare. Capătul 5'-OH terminal al nucleotidei va reacționa cu nucleotida (monomer). Acest compus are atașat esteric la gruparea 3'-OH un rest de N,N'-diizopropil, metoxi (sau 2-cianoetiloxi) fosforamiditic. Grupările amino ale bazei azotate sunt blocate, de asemenea este blocată prin tritilare și gruparea 5'-OH. Reacția are loc în cataliză acidă realizată de tetrazol. Spre deosebire de sinteza Merrifield, chiar în condițiile unui exces de monomer, reacția nu este totală, rămânând grupări 5'-OH terminale nereacționate.
3. Blocarea grupărilor 5'-OH terminale nereacționate. Această operațiune se face cu anhidridă acetică, in prezență de N-metilimidazol cu funcție catalitică.
4. Oxidarea cu soluție de iod a fosforului fosfidic la fosfor fosfatic. Dacă urmează adăugarea de noi nucleotide se reia ciclul de la prima etapă. Dacă nu, se trece la ultima etapă.

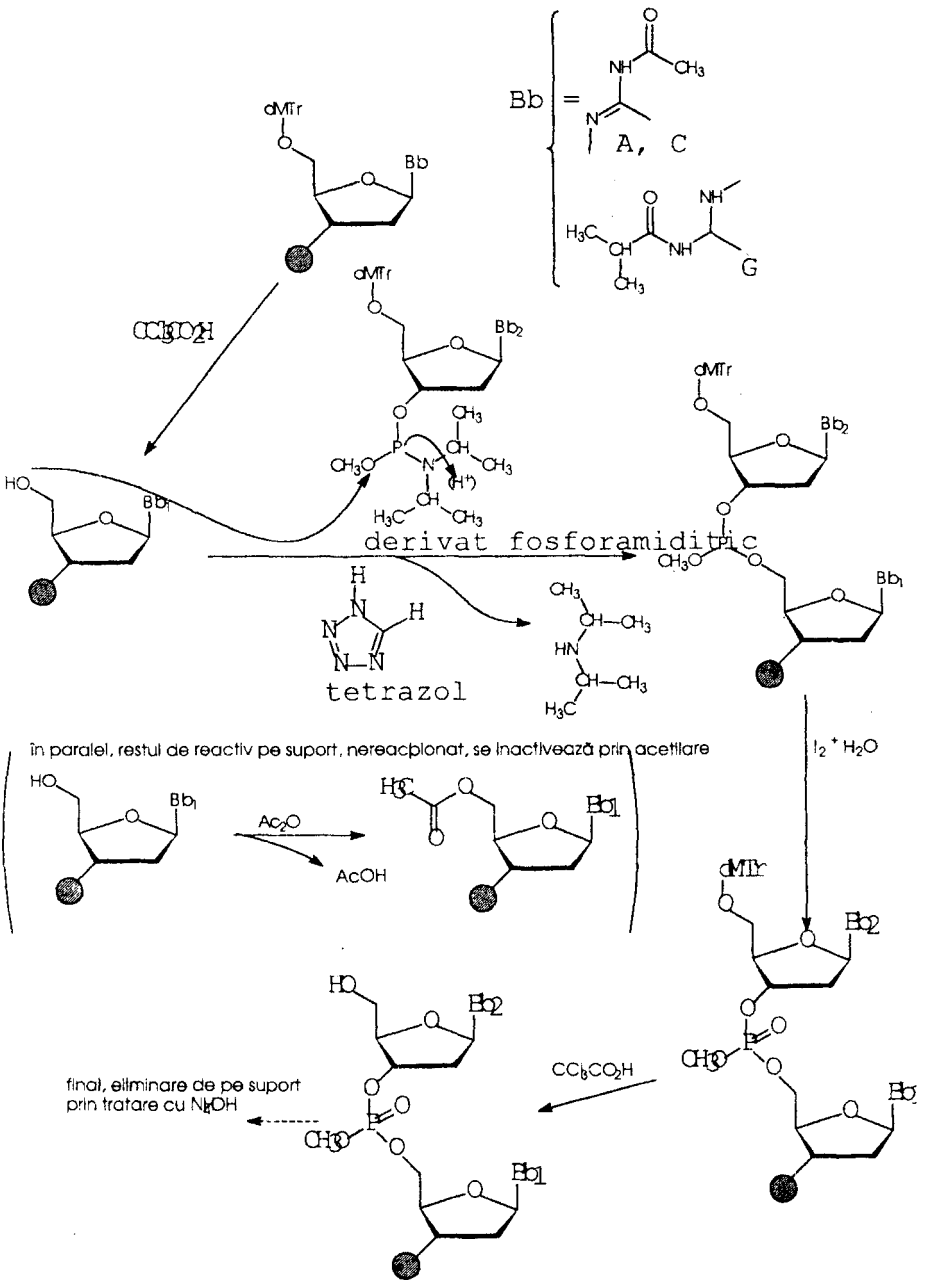


Fig.5.37. Schema de sinteză chimică, pe suport solid, a fragmentelor oligonucleotidice

5. Deprotejarea tuturor grupărilor blocate din moleculă prin tratare cu soluție de amoniac.

5.6.3. Amplificarea (multiplicarea enzimatică) a fragmentelor ADN - metoda PCR (Polimerase Chain Reaction sau policondensarea controlată enzimatic)

Apariția acestei metode a revoluționat metodologia manipulărilor genetice. Pe această cale devine posibilă obținerea unui mare număr de fragmente identice plecând de la un fragment inițial aflat în cantitate extrem de redusă. Amplificarea este de ordinul miliardelor de ori, iar timpul în care se realizează aceasta este de câteva ore. A fost inventată de Kary MULLIS în 1984.

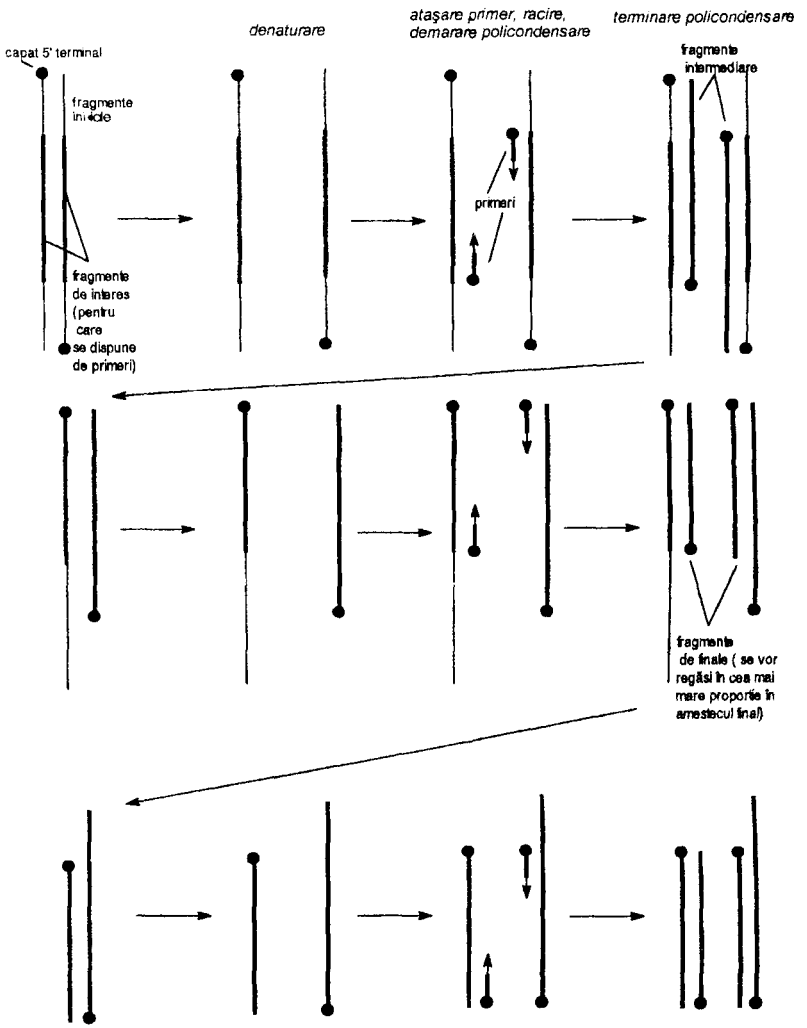
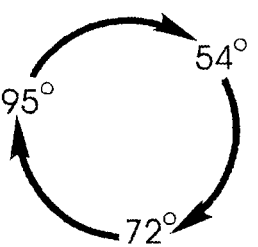

denaturare
atașare primer, racire, demarare policondensare
terminare policondensare
capat 5' terminal
fragmente inițiale
primeri
fragmente intermediare
fragmente de interes (pentru care se dispune de primeri)
fragmente finale (se vor regăsi în cea mai mare proporție în amestecul final)

Fig.5. 38. Schema de principiu a tehnicii PCR (polymerase chain reaction)

Atât principiul cât şi realizarea practică sunt extrem de simple (*Fig.5.38.*): Un fragment dublu catenar ADN va servi, după disocierea celor două catene, drept dublă matriţă pentru *ADN-polimerază*, în prezenţa unor fragmente oligonucleotidice cu rol de *primeri.* Primerii au o lungime de 20 –30 de nucleotide şi sunt complementari cu capetele 3'0H terminale[71]. Ei se introduc în mediu într-un mare exces faţă de fragmentul destinat amplificării. Într-o primă etapă are loc încălzirea amestecului la 95°C timp de 15 s, ceea ce duce la *disocierea totală* a celor două catene ale duplexului ADN. Prin *răcire* rapidă la 54°C, se va realiza împerecherea monocatenelor intacte cu primerii, datorită largului exces al acestora. În a treia etapă, prin acţiunea ADN polimerazei are loc *sinteza catenelor complementare* astfel încât populaţia ADN destinată amplificării se va dubla. Sinteza noilor catene are loc la 72°C timp de aproximativ 30 s. Sensul de sinteză al noilor catene este 5' - 3', sens dictat de mecanismul de funcţionare al ADN polimerazei (vezi replicarea). O nouă încălzire la 95°C, va disocia duplexurile existente, reluându-se în acest mod un nou ciclu de sinteză. Teoretic numărul de indivizi care pot fi obţinuţi de la o monocatenă este de 2^n unde n este numărul de cicluri.

Metoda a putut fi pusă la punct după descoperirea de ADN polimeraze provenind din bacterii termofile. Cea comun utilizată este *taq*ADN-polimeraza provenind din *Thermus aquaticus.* Această bacterie trăieşte în ape termale la aproximativ 65°C.

Practic, cu toţi componenţii mediului de reacţie, amplificarea presupune doar realizarea ciclului termic. De aceea metoda a fost pusă la punct odată cu realizarea aparatelor de ciclare termică pentru realizarea succesiunii:



[71] Primerii sunt fragmente monocatenare de ARN pe care are loc ataşarea secvenţei oligo- sau polinucleotidice care va fi sintetizată. Vezi în vol. II replicarea. Uneori, primerii sunt complementari cu o porţiune neterminală a catenei care serveşte ca matriţă. Evident sinteza monocatenei ADN, catalizată de ADN polimerază se va face plecând de la aceşti primeri in sensul 5'–3' al noii catene, respectiv 3'–5' al catenei matriţă.

Dintre caracteristicile care fac din metoda PCR un instrument redutabil în mâna specialiștilor amintim:

- nu este necesară cunoașterea secvenței întregului fragment destinat amplificării, ci doar a capetelor 3' terminale ale celor două catene, pentru obținerea primerilor. Mai mult secvențele cunoscute pot să nu fie capetele efective ale catenei, ci să se situeze undeva în interiorul acestora. În acest caz, amplificarea se va face plecând de la aceste fragmente spre interior.

- ♦ viteza mare de sinteză
- ♦ specificitate conferită de acuratețea hibridizării la temperatură ridicată (54°C).

Introducerea în uzul curent al acestei tehnici a simplificat extrem de mult procesele de clonare și de secvențare a ADN. Mai mult, tehnica PCR a revoluționat procedeele de diagnostic precoce, prin identificarea unor fragmente de ADN viral sau bacterian. Astfel poate fi demonstrată prezența virusului SIDA înainte de apariția răspunsului imun. Detecția acestor fragmente se face la concentrații incredibil de mici ale acestora, deci în fazele incipiente ale maladiei. De asemenea testele de stabilire a paternității, precum și de identificare a unor indivizi după urme extrem de reduse cantitativ reprezintă alte aplicații ale tehnicii PCR în lumea medicinii legale, pentru a aminti implicațiile oferite de identificarea modificărilor mutaționale ale genelor, utilizate în diagnosticul precoce al cancerului dar și în controlul terapiei acestuia.

Limitările metodei țin de lungimea fragmentului supus amplificării, care nu poate fi mai mare de 10000 pb, precum și de existența primerilor. Totuși progresele făcute în sinteza fragmentelor oligonucleotidice lasă deschis un viitor activ metodei PCR.

Bibliografie selectivă

Bibliogafie generală

- Alberts, B. Bray, D., Lewis, J. Raff M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994, *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Pub. Inc., New-York, London
- Apps, D.K., Cohen, B.B, Steel, C.M., *Biochemistry*, 1992; Bailliere Tindall, London
- Becker, W.M., Reece, J.B., Poenie, M.F. 1995; *The World of the Cell*, 3rd ed., Benjamin / Cummigs Pub. Menlo Park, Reading, New-York
- Campbell, M.K. 1995, *Biochemistry*, 2nd edition; Saunders College Pub, Philadelphia
- Gârban, Z., 1996, *Tratat elementar de biochimie*, Ed. Mirton, Timișoara
- Goodwin, T.W., Stumpf, P.K., Mercer, E.I., 1982, *Plant biochemistry*, 2nd edition, Pergamon Press
- Lehninger, A.L. 1987, 1992, *Biochimie*, Ed Tehnică, vol 1 și 2, București
- Neamțu, G., Cîmpeanu, Gh., Socaciu, C. 1993, *Biochimie vegetală*, Ed. Did și Ped. București,
- Rawn, J.D. 1989, *Biochemistry*, Neil Patterson Pub., Borlington, North Carolina
- Stryer, L, 1995, *Biochemistry*, 4th ed.; W.H. Freeman & Co., New York
- Țărmure, C. 1996, *Biochimie structurală și metabolică*, Vol I., Ed. Dacia, Cluj-Napoca
- Voet D., Voet J.G. 1995, *Biochemistry* 2nd ed., John Wiley & Sons, New York
- Zubay G.L., Parson W.W., Vance D.E. 1995, *Principles of Biochemistry*; Wm. C. Brown Pub.Dubuque, Iowa

Capitolul 1.

- Dumitriu S., ed. 1995, *Polysaccharides in Medicinal Applications*, Marcel Dekker, Ink., New York, Basel, Hong Kong
- El Khadem, Hassan Saad, 1988, *Carbohydrate chemistry*, Academic Press, San Diego

- Gabius, H.J., Gabius S., 1997, *Glicosciences*, Chapmann & Hall, Weinheim
- Hook, M., Kjeleen, L. Johansson, S., Robinson J. 1984, *Cell-Surface Glycosaminoglycans*, Ann. Rev. Biochem. **53**: 847
- Neamțu, G., Irimie, Fl. 1991, *Fitoregulatori de creștere*, Ed. Ceres, București

Capitolul 2.

- Op der Kamp, J.A.F. 1979, *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 47
- Singer, S.J. Nicholson, G.L. 1972, *The Fluid Mosaic Model of the structure of Membranes*, Science, **175**, 720
- Stoffel, W. Sfingolipids,1971, *Ann. Rev. Biochem.* **40**: 57
- Unvin, N. Henderson, R, 1984, *The structure of proteins in biological membranes*, Sci Am., **250**:78

Capitolul 3.

- *Banca de proteine* în format pdb. (**P**rotein **D**ata **B**ank) la adresa: http://www.pdb.bnl.gov/pdb-bin/pdbmain
- Branden, C., Tooze, J. 1991, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York Creighton, T.E. 1993, *Proteins*, 2nd edition, W.H. Freeman & Co., New York
- Creighton, T.E. 1990, *Protein function, a practical approach*, 2nd edition, IRL Press, Oxford, New-York, Tokyo
- Creighton, T.E. 1990, *Protein structure, a practical approach*, 2nd edition, IRL Press, Oxford, New-York, Tokyo
- Cuiban, Fl., Lupea, A. X. 1989, *Studiul structurii și sinteza peptidelor*, Ed. Academiei, București
- Peakman M., Vergani D. 1997, *Basic and Clinical Immunology*, Churchill Livingstone New-York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco and Tokyo
- Programul de vizualizare moleculară *Rasmol*, care poate fi obținut gratuit la http:// www.umass.edu/microbio/rasmol/

Capitolul 4.

- Anderson, V. E.; LaReau, R. D. „Hydride Transfer Catalyzed by Lactate Dehydrogenase Displays Absolute Stereospecificity at C4 of the Nicotinamide Ring," J. Am. Chem. Soc.1988, **110**, 3695–3697.

- Bergmeyer, H.U. Gawehn, K. 1978, Principles of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- Cojocaru, D.C. 1996, Biochimia vitaminelor, Ed. Gama, Iași
- Cornish-Bowden, A. 1995, Fundamentals of Enzyme Kinetics, Rev. Ed., Portland Press, London
- DeTar, D. F., Binzet, S., Darba P., J. Org. Chem, 1985, **50**, 2826–2836
- Dixon, M., Webb, E.C. 1979, Enzymes, 3rd Ed., Academic Press, New York
- Fersht, A. 1985, Enzyme Structure and Mechanism, 2nd Ed., Freeman, New York.,
- Irimie, Fl. Morar, A. Bojin M., Catalytic antibodies, Studia Univ. Babeș-Bolyai, ser. chem 1995, **40**, 209–252
- Neamțu, G. 1996, Substanțe naturale biologic active, Vol.I Vitamine, Ed. Ceres, București

Capitolul 5.

- Rich, A, Nordheim, A.. Wang A. H.-J. J, 1984, *The chemistry and biology of left handed Z-DNA*, Ann. Rev. Biochem., **53**, 791
- Niță-Lazăr M, 1994, *Tehnica reacției de polimerizare în lanț*, St. cerc. biochim. **37**:1–2, 533